

***SFL1* kodiert für einen Inhibitor  
der Zell-Zellaggregation und der Hyphenbildung  
in *Candida albicans***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena



von Diplom-Biologin Janine Bauer,  
geboren am 29.09.1980 in Rudolstadt

Jena, Juni 2008

Gutachter:

Prof. Jürgen Wendland, Kopenhagen

Prof. Hans-Peter Saluz, Jena

PD Dr. Michael Weig, Göttingen

Tag der Disputation:

03.11.2008

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1 Der humanpathogene Pilz <i>Candida albicans</i> .....	4
1.2 Morphologie des Pilzes.....	5
1.3 Regulation der Filamentierung .....	6
1.4 Genomanalyse in <i>Candida albicans</i> .....	8
1.5 Flockulierung bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
1.6 Adhäsion bei <i>Candida albicans</i> .....	11
1.7 Genfamilien in <i>Candida albicans</i> .....	12
1.8 Aufbau und Wirkungsweise antifungaler Substanzen .....	13
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1 Verwendete Stämme .....	16
2.2 Verwendete Medien.....	17
2.3 Klonierung und Amplifikation von Plasmiden.....	18
2.3.1 Isolierung und Ligation von DNA-Fragmenten .....	18
2.3.2 Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	18
2.3.3 Transformation und Selektion von <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.3.4 Plasmid-Mini-Präparation mittels alkalischer Lyse .....	19
2.3.5 Verifizierung der korrekten Fragmentintegration.....	19
2.3.6 Plasmid-Midi-Präparation .....	20
2.4 Deletionen und Fusionen der <i>Candida albicans</i> Gene .....	21
2.4.1 Analyse der genomischen Sequenz und Oligonukleotidkonstruktion.....	21
2.4.2 PCR-basierte Gendisruption in <i>Candida albicans</i> .....	21
2.4.3 Transformation von <i>Candida albicans</i> .....	25
2.4.4 Verifizierung der <i>Candida albicans</i> -Mutanten.....	25
2.4.5 Isolierung genomischer DNA aus <i>Candida albicans</i> .....	26
2.5 Mikroskopie und Bildbearbeitung .....	27
2.6 Ein-Hybrid-Assay .....	27
2.7 RNA-Isolierung und RT-PCR .....	29
2.8 Selektion der <i>TLO</i> prom- <i>URA3</i> -Fusionsmutanten mit 5'FOA.....	30
2.9 Herstellung der <i>TLO34</i> -Deletionsmutante.....	30
2.10 Testung antifungaler Substanzen .....	31
2.11 Schweinedarmepithel-Assay.....	32

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	Funktionsanalyse von <i>SFL1</i> in <i>Candida albicans</i> .....	35
3.1.1	Identifizierung und Sequenzvergleich des <i>Candida albicans SFL1</i> Gens .....	35
3.1.2	Deletion von <i>SFL1</i> in <i>Candida albicans</i> .....	38
3.1.3	Zell- und Koloniemorphologie des Deletionsstammes <i>sfl1/sfl1</i> .....	39
3.1.4	Quantifizierung der Zellaggregate .....	40
3.1.5	Zellaggregatbildung unter verschiedenen Wachstumsbedingungen .....	42
3.1.6	Einfluss zellwand- und membranzerstörender Substanzen .....	45
3.1.7	Methioninpromotor-kontrollierte Genexpression von <i>SFL1</i> .....	47
3.1.8	Wachstumsmorphologie unter mikroaerophilen Bedingungen .....	49
3.1.9	Quantifizierung des Hyphenwachstums der <i>sfl1</i> -Deletionsmutante.....	50
3.1.10	Subzelluläre Lokalisierung von Sfl1 mittels einer <i>SFL1</i> -GFP-Fusion.....	51
3.1.11	Ein-Hybrid-Assay .....	53
3.1.12	Expressionsnachweis hyphenspezifischer Gene in der <i>sfl1</i> -Deletionsmutante ...	55
3.2	Analyse der <i>ALS</i> -Genfamilie .....	56
3.2.1	<i>ALS</i> -Promotorbindestellen von CaSfl1 .....	56
3.2.2	Überexpression von <i>ALS1</i> und <i>ALS3</i> .....	58
3.3	Identifizierung der <i>TLO</i> -Genfamilie in <i>Candida albicans</i> .....	59
3.3.1	Genomanalyse bezüglich <i>TLO</i> -Lokalisierung und -Identität .....	59
3.3.2	Identifizierung von <i>TLO</i> -Genen in anderen Spezies .....	62
3.3.3	Sequenzierung einzelner <i>TLO</i> -Gene.....	63
3.3.4	Selektion von <i>TLO</i> prom- <i>URA3</i> -Fusionsmutanten mit 5-FOA.....	64
3.3.5	Die Deletionsmutante <i>TLO34</i> .....	66
3.4	Testung antifungaler Substanzen .....	68
3.4.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen .....	68
3.4.2	Identifikation sensibler und resistenter Deletionsmutanten mit der <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Deletionsstammbank .....	70
3.4.3	Wirkungsnachweis der Substanzen auf Darmepithel .....	72
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>
4.1	Das <i>Candida albicans SFL1</i> -Gen ist ein Homolog des <i>ScSFL1</i> .....	74
4.2	Sfl1 reprimiert die Flockulierung und Hyphenbildung .....	74
4.3	CaSfl1 ist ein Transkriptionsrepressor .....	75
4.4	Regulation von <i>SFL1</i> .....	76
4.5	Sfl1 reguliert hyphenspezifische Gene .....	77
4.6	Zell-Zell-Adhäsion und Hyphenbildung in <i>Candida albicans</i> .....	80
4.7	Die <i>TLO</i> -Genfamilie .....	82

4.8	Resistenzmechanismen gegenüber Antimykotika .....	85
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
5.1	Fachliteratur .....	89
5.2	Eigene Veröffentlichungen .....	100
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>104</b>

## Zusammenfassung

Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* vollzieht einen morphologischen Wechsel von Hefe- zu Hyphenzellen. Bei dieser Änderung der Morphologie spielen Umweltsignale und deren Wahrnehmung durch die Zelle mit verschiedenen Signalkaskaden und der Reaktion mit der Expression verschiedener Morphologie-verändernder Gene eine Rolle.

In dieser Arbeit wurde das *Candida albicans* Homolog des *Saccharomyces cerevisiae* *SFL1* Gens identifiziert und charakterisiert. In *S. cerevisiae* kodiert *SFL1* für den „suppressor of flocculation“ und reguliert die Expression sog. Flockulierungsgene, die einen entscheidenden Beitrag zur Zell-Zellaggregation liefern. Mittels PCR-basierter Gendisruption wurden die kompletten offenen Leseraster der beiden *SFL1*-Allele in dem diploiden Pilz *Candida albicans* deletiert. Der *C. albicans* *sf11/sf11*-Deletionsstamm zeigt die Ausbildung von Zell-Zellaggregaten und Hyphenzellen in Minimalmedium unter nicht hypheninduzierenden Bedingungen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Änderung des pH-Wertes des Mediums vom leicht sauren in den neutralen bis leicht basischen Bereich zu einer verstärkten Zell-Zellaggregation der *sf11/sf11*-Deletionsmutante führt. Die Ausbildung von Hyphenzellen unter mikroaerophilen Bedingungen ist bei der *sf11/sf11*-Deletionsmutante verstärkt. Eine Überexpression von *SFL1* vor der Induzierung zur Hyphenbildung durch Fusion des ORF mit dem regulierbaren Promotor des *C. albicans* *MET3*-Gens führte dazu, dass unter hypheninduzierenden Bedingungen, wie eine Temperaturerhöhung auf 37°C und die Anwesenheit von Serum, keine Hyphen ausgebildet werden konnten. Mit Hilfe der Fusion des offenen Leserahmens mit dem Grün-Fluoreszierenden-Protein (GFP) konnte die Lokalisierung des Proteins im Nukleus der Zelle gezeigt werden. Ein Ein-Hybrid-Assay gab Aufschluss darüber, dass Sfl1 nicht als Transkriptionsaktivator fungiert. Eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR der hyphenspezifischen Gene *ALS1*, *ALS3*, *HWPI* und *ECE1* zeigte, dass diese Gene bereits unter nicht-hypheninduzierenden Bedingungen bei der *sf11/sf11*-Deletionsmutante exprimiert werden. Diese verschiedenen Versuche, die *MET3*-Promotor getriebene Überexpression, der Ein-Hybrid-Assay und die Expressionsanalyse belegen, dass Sfl1 als Transkriptionsrepressor der hyphenspezifischen Gene fungiert. Des Weiteren wurde durch RT-PCR eine erhöhte Expression des *FLO8*-Gens in den Hefezellen der Deletionsmutante festgestellt. CaSfl1 kann somit als Repressor der Hyphenbildung und Zell-Zell-Adhäsion beschrieben werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die *TLO*-Genfamilie in *Candida albicans* identifiziert. Diese besteht aus 14 Genen (*TLO1* bis *TLO5*, *TLO7* bis *TLO13*, *TLO16* und *TLO34*), die eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander aufweisen und jeweils telomernah lokalisiert sind. Die *TLO*-Gene können aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit im 5'- und 3'-Bereich in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine Genstilllegung dieser telomernah assoziierten Gene wird, aufgrund der Lokalisierung dieser Gene mit einem Abstand von weniger als 20kbp vom Telomerende, angenommen. Die Möglichkeit eines Telomeric Silencing, der transkriptionellen Repression telomernaher Sequenzen durch spezifische Proteine, wie Histondeacetylasen, der *TLO*-Gene und anderer telomernaher Gene wurde untersucht. Für die Untersuchung von Telomeric Silencing der *TLO*-Gene wurden die Promotoren zweier dieser Gene, von *TLO3* und *TLO8*, mit dem offenen Leseraster des *URA3*-Gens fusioniert und homolog ins *C. albicans* Genom integriert. Die entstandenen Stämme wurden mit 5-FOA selektiert, was zu einer hohen Frequenz an *ura*<sup>-</sup>-Zellen führte. Die Ursache für dieses Auftreten von *ura*<sup>-</sup>-Kolonien wurde anfänglich in Telomeric Silencing gesehen. In dieser Arbeit konnten dafür jedoch keine Belege gefunden werden. Es ist davon auszugehen, dass es sich aufgrund von Wiederholungssequenzen nahe den *TLO*-Genen um interchromosomale Umlagerungen handelt, die zum Verlust der Heterozygotie an diesen Loci führte und somit ein *ura*<sup>-</sup>-Genotyp und Phänotyp entstand. Die Mutationsrate der *TLO*-Promotor-*URA3*-Fusionsstämme resultiert demnach aus einer Rekombination von Wiederholungssequenzen und dem Verlust von Chromatiden. Des Weiteren wurde *TLO34*, das *TLO*-Gen mit dem längsten offenem Leseraster, in *C. albicans* deletiert, so dass eine *tlo34/tlo34*-Deletionsmutante entstand. Diese Deletionsmutante wurde mikroskopisch auf phänotypische Besonderheiten hin untersucht. Allerdings zeigt eine Deletion von *tlo34* keine phänotypischen Veränderungen.

Am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie wurden verschiedene Substanzen mit den Bezeichnungen HKI-Nr. 9726054, 10126132 und 10226069 aus einer Substanzdatenbank aufgrund ihrer antifungalen, nicht zytotoxischen Wirkung für weitere Testungen ausgewählt. Mittels einer *S. cerevisiae*-Deletionsstammbank sollten die o. g. Substanzen auf ihre spezifische Wirkung und Angriffspunkte in der Zelle hin getestet werden. Dabei wurden resistente und sensitive Deletionsstämme identifiziert. Die Identifizierung einer sensitiven *erg6*-Deletionsmutante gibt Rückschlüsse auf die Wirkung der Substanz Nr. 10126132 als Sterolbiosyntheseinhibitor.

## 1. Einleitung



## 1. Einleitung

### 1.1 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans*

*Candida albicans* ((Robin) Berkhout, 1923) ist ein Pilz der Familie der *Saccharomycetales* innerhalb der Ordnung Ascomycota. Kennzeichnend für diese Gruppe ist die Fähigkeit zur vegetativen Zellteilung durch Knospung oder Spaltung. Ebenso können Vertreter dieser Gruppe einen Thallus aus Myzelien mit Septen und mehreren Poren ausbilden. Die Fruchtkörper bestehen aus einem kleinen Ascus oder Ketten dieser Asci, die sich innerhalb eines Apotheciums befinden. Die Asci variieren in ihrer Form. Bei Abwesenheit dieser diagnostischen Form können die Ascomycota anhand ihrer zweischichtigen Hyphenwand beschrieben werden (Guarro *et al.*, 1999). Verwandte Spezies des Pilzes sind unter anderem die Ascomyceten *Aspergillus fumigatus*, *Ashbya gossypii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *Kluyveromyces lactis*.

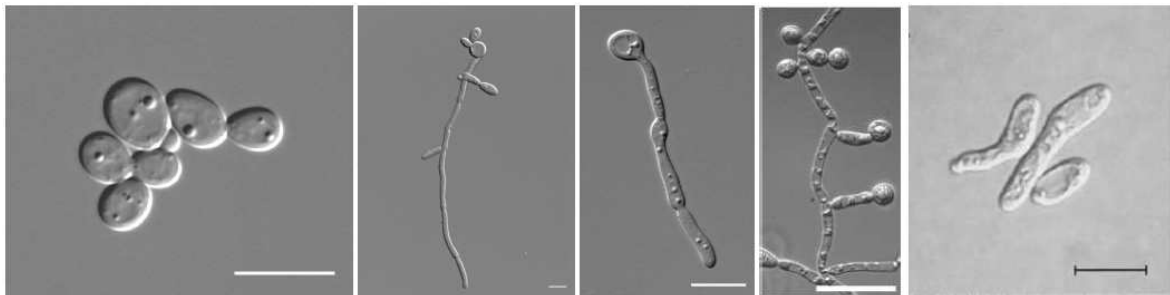
Mehr als 17 verschiedene *Candida*-Arten wurden als Krankheitserreger von Blutkreislaufinfektionen identifiziert, von denen ca. 95% durch die vier Spezies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* verursacht werden (Hajjeh *et al.*, 2004; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003; Pfaller und Diekema, 2004). *Candida albicans* weist einen Verbreitungsgrad innerhalb der menschlichen Population von 70-90% auf (Bille *et al.*, 2005). Er ist daher der am häufigsten vorkommende Pilz beim Menschen (Edwards, 2000; Edmond *et al.*, 1999). Dieser Pilz kann insbesondere im Magen-Darm-Trakt und an Schleimhäuten nachgewiesen werden. Im Falle eines intakten Immunsystems tritt dieser Pilz als Kommensale auf. Bei Immunsupprimierung, beispielsweise durch Organtransplantation, Chemotherapie oder HIV-Infektion, kann es zu einer systemischen, invasiven Infektion mit *C. albicans* kommen (Odds, 1988). Hierbei durchdringt der Pilz die Darmwand und es kommt zu einer Infektion des Blutkreislaufs. Immunsupprimierte Menschen sind besonders empfänglich für eine Infektion mit *Candida ssp.* (Shepherd *et al.*, 1985; Dupont, 1995; Weig *et al.*, 1998). Candidiasis ist derzeit die vierthäufigste Nosokomialinfektion mit einer Mortalitätsrate von ca. 35% (Edmond *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 1998).

## 1.2 Morphologie des Pilzes

Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* ist in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen in der Lage, als Blastosporen, das sind ellipsoide, sich durch Knospung teilende Zellen, oder in der Form von elongierten, mehrzelligen Zellen, sog. Hyphenzellen zu wachsen (Abbildung 1). Die einzellige, ellipsoide Zellform ist vergleichbar mit der Zellform der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, weshalb hier oft von einer hefezellartigen Wachstumsform gesprochen wird. Diese Zellen vermehren sich durch Knospung von alternierenden Zellpolen, indem an einer zuvor festgelegten Stelle ein Knospungsring angelegt wird. Die elongierten, mehrkernigen Zellen werden als Hyphen bezeichnet, wobei keine vollständige Zelltrennung erfolgt. Die Hyphenzellen beginnen an Hefemutterzellen zu elongieren, so dass eine Hyphenzelle der vielfachen Länge einer Hefezelle entspricht. Kennzeichnend für echte Hyphen sind deren genau parallele Zellwände mit einem Abstand von ca. 2µm ohne Abschnürungen (Sudbery *et al.*, 2004). Bei einer sich entwickelnden Hyphenzelle bildet sich nahe der Trennlinie zwischen Mutter- und Tochterzelle ein Septinring aus. Bei der Entwicklung einer echten Hyphenzelle verschwindet dieser Septinring und ein weiterer wird entlang der Hyphe gebildet. Hyphenzellen sind daher durch Septen kompartimentiert (Sudbery, 2001). Die morphologische Veränderung von Hefen- zu Hyphenzellen ist essentiell für die Virulenz bei systemischen Infektionen (Anderson und Odds, 1985; Soll, 2002).

Bei *Candida albicans* sind weitere morphologische Formen bekannt, die man als Pseudohyphen, Chlamydosporen und opaque Zellen bezeichnet (Abbildung 1). Pseudohyphen bilden elongierte Ausläufer aus, die sich von den Hyphen durch eine Verengung an den Septierungsstellen unterscheiden. Diese Zellen sind mit mindestens 2,8µm breiter als Hyphenzellen und stellen einen Übergang von hefe- zu hypheartigem Wachstum dar (Sudbery *et al.*, 2004). Diese Zellform ist ebenfalls von *S. cerevisiae* bekannt (Gancedo, 2001). Als Chlamydosporen werden runde, terminale, asexuelle Sporen bezeichnet. Diese Zellen sind bei *C. albicans* drei- bis viermal so groß wie eine Hefezelle, besitzen eine zweischichtige Zellwand und werden unter sehr definierten Bedingungen, wie nährstoffarmes Medium, das mit Detergenzien versetzt ist, und Inkubation bei Raumtemperatur unter sauerstoffarmen und dunklen Lichtverhältnissen, bei *C. albicans* gebildet (Staib und Morschhäuser, 2007). Die biologische Funktion dieser Chlamydosporen ist allerdings noch weitgehend ungeklärt. Des Weiteren ist bei *C. albicans* die opaque-Form als charakteristische Paarungs-kompetente Zellform beschrieben, die bei

Paarungstyp-Lokus (Mating-type-locus, MTL)-homozygoten Zellen vorkommt. Opaque Zellen weisen eine um  $10^6$ fach erhöhte Paarungsrate auf als weiße Zellen. Die Veränderung von weißen, halbkugelförmigen Kolonien zu großen, flachen und grauen Kolonien geschieht spontan mit unterschiedlicher Frequenz in Abhängigkeit vom untersuchten Stamm (Miller und Johnson, 2002; Soll, 2004).



**Abbildung 1. Morphologieformen von *Candida albicans*.**

Die Abbildungen zeigen den Pilz *Candida albicans* in Hefeform, in Hyphenform, als Pseudohyphe, die Chlamydosporen des Pilzes (Dünkler, 2007) und opaque Zellen (Miller und Johnson, 2002). Größenbalken 10µm und 30µm (Chlamydosporen).

### 1.3 Regulation der Filamentierung

Der Organismus vollzieht den reversiblen Wechsel von Hefe- zu Hyphenzellen unter hypheninduzierenden Bedingungen, wie einer Umgebungstemperatur von 37°C und dem Vorhandensein von Serum (Whiteway und Oberholzer, 2004). Ebenso haben der pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration einen Einfluss auf die Hypheninduktion. Ein physiologischer pH-Wert von 7,0 bei einer Temperatur von 37°C sind filamentinduzierend (Fonzi, 2002). Ein niedriger pH-Wert von 4,0 ist dagegen filamentinhibierend. Hier ist überwiegend die Hefezellform vorhanden (Buffo *et al.*, 1984).

Die morphologische Veränderung von Hefe- zu Hyphenzellen wird durch die Signaltransduktionswege Proteinkinase A (PKA)- und den Mitogen-aktivierten Proteinkinase- (Mitogen-activated protein kinase pathway, MAPK)-Signaltransduktionsweg vermittelt. Umweltsignale, wie beispielsweise die Anwesenheit von Serum, führen zur Aktivierung von Ras1, einem GTP-binde-Protein. Die vermittelnde Komponente des Serums hat ein niedriges Molekulargewicht von weniger als 1kDa (Feng *et al.*, 1999). Ebenso werden die externen Stimuli, wie Stickstoff- und Zuckerlimitierung, sowie die Anwesenheit von Aminosäuren und N-Acetylglucosamin, über diese Signaltransduktionswege reguliert. Der MAPK-Signaltransduktionsweg wird durch Ras1 aktiviert, indem die Serin/Threoninkinase, Cst20, aktiviert wird (Leberer *et al.*, 1996; Köhler und Fink, 1996). Die MAP-

Kinase Ste11 vermittelt vermutlich, analog der Signalkaskade in *S. cerevisiae*, die Signaltransduktion von Cst20 zu Hst7 (Lee *et al.*, 2005; Bennett und Johnson, 2005; Köhler und Fink, 1996). *CEK1* kodiert für eine MAP-Kinase, homolog dem *S. cerevisiae* Kss1, und interagiert mit der Kinase Hst7 (Csank *et al.*, 1998). Der Transkriptionsfaktor Cph1 ist das Zielprotein dieser Signalkaskade (Liu *et al.*, 1994). Dieser Transkriptionsfaktor kontrolliert die Expression hyphenspezifischer Gene, wie *HWPI* und *ECE1*. Der PKA-Signaltransduktionsweg wird ebenfalls über Ras1 aktiviert. Das G-Protein Ras1 interagiert mit der Adenylatcyclase Cyr1 (Cdc35), die den sekundären Botenstoff cAMP aus ATP bildet (Rocha *et al.*, 2001; Borges-Walmsley und Walmsley, 2000; Gancedo, 2001; Fang und Wang, 2006). Dieses cAMP ist ein universeller sekundärer Botenstoff, der für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie auch morphologische Veränderung und die Virulenz, essentiell ist. Die katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A, Tpk1 und Tpk2, werden durch cAMP aktiviert (Bockmühl *et al.*, 2001; Cloutier *et al.*, 2003). Ziel der Phosphorylierung durch Tpk2 ist der Transkriptionsfaktor Efg1 (Sonneborn *et al.*, 2000; Tebarth *et al.*, 2003). Efg1 aktiviert hyphenspezifische Gene, wie *HWPI*, *ECE1*, *HYR1* und *SAP*-Gene (Bassilana *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 2001; Nantel *et al.*, 2002).

Eine physiologische CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5,5% ist ebenfalls filamentinduzierend. Extrazellulär aufgenommenes oder intrazellulär gebildetes CO<sub>2</sub> wird durch  $\beta$ -Carbonanhydrasen in Bicarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) umgewandelt. Dieses Bicarbonat aktiviert die Adenylatcyclase, was zu einer Bildung von cAMP führt (Bahn und Mühlischlegel, 2006; Sheth *et al.*, 2005). Der CO<sub>2</sub>-Signalweg umgeht also Ras1 und die Filamentierung wird direkt durch den PKA-Signaltransduktionsweg gesteuert. Hierbei kommt es nicht zu einer Ras1-Cyr1-Interaktion.

Filamentierung findet ebenfalls unter Sauerstofflimitierung, wie etwa unter mikroaerophilen Bedingungen, statt. Diese wird durch den Transkriptionsfaktor Czfl1 reguliert und den PKA-Signaltransduktionsweg gesteuert (Vinces *et al.*, 2006).

#### 1.4 Genomanalyse in *Candida albicans*

Das Genom von *Candida albicans* ist sequenziert und in der Assemblierung 20 (www.candidagenome.org) annotiert (van het Hoog *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2004; Nantel, 2006). Das Genom mit einer Gesamtgröße von 16 Mbp besteht aus acht Chromosomen mit einer Länge von 0,95 bis 3 Mb, benannt mit 1 bis 7 und R, die insgesamt für mindestens 11615 mögliche Gene kodieren (Nantel, 2006; van het Hoog *et al.*, 2007). *C. albicans* ist obligat diploid, das heißt, jedes annotierte Allel ist in zweifacher Kopie im Genom vorhanden und bisher ist bei diesem Organismus keine Meiose beschrieben (Jones *et al.*, 2004). Allerdings sind in *C. albicans* auch triploide und aneuploide Sequenzen bekannt. Aneuploide Allele sind beispielsweise die *MTL*-Gene (Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2000; Tzung *et al.*, 2001). Die genomische Vielfalt des Organismus ist bedingt durch verschiedene Ereignisse, den Chromosomenlängenpolymorphismus (CLP), die Translokation an den MRS-Loci, Chromosomendeletionen und die Trisomie einzelner Chromosomen (Chibana *et al.*, 2000). Der CLP resultiert aus der Größenveränderung der 2,1kbp langen Wiederholungssequenz RPS (short periodic repetitions) innerhalb des Genoms (Chibana *et al.*, 1994). Die intermediäreren Wiederholungssequenzen (Major repeat sequence, MRS) kommen, zumindest teilweise, auf jedem Chromosom, bis auf Chromosom 3, vor. Sie sind Stellen ektopischer Paarungen für Rekombination und führen so zu Translokationen zwischen nichthomologen Chromosomen (Chiabana *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2005). Des Weiteren sind die subtelomeren, repetitiven Sequenzen CARE-2 in *C. albicans* beschrieben (Lasker *et al.*, 1992). Chromosomendeletionen sind für Chromosom 5 und 4 bekannt. Hierbei führt eine Deletion oder ein teilweiser Verlust eines der Chromosom 5-Homologen zu einer Sorbose-Assimilation. Die Expression des dazu nötigen Gens, *SOU1*, ist abhängig von der Monosomie dieses Gens (Janbon *et al.*, 1998). Des Weiteren führen der Verlust eines Chromosom 4-Homologen und die Aneuploidie eines Chromosom 5-Fragmentes zu einer Resistenz gegenüber Azol-Antimykotika (Perepnikhatka *et al.*, 1999; Selmecki *et al.*, 2006). Natürlich vorkommende Trisomien sind die des Chromosoms 1 und des Chromosoms 2 des Laborstammes CAI-4. Die Trisomie der Chromosoms 1 führt zu verminderter Virulenz (Chen *et al.*, 2004; Selmecki *et al.*, 2005). Eine Chromosom 3-Trisomie wurde in einem Fluconazol-resistenten Stamm beschrieben (Perepnikhatka *et al.*, 1999). Trisomien essentieller Gene können durch die Integration der zur Transformation verwendeten UAU-Kassette entstehen (Legrand *et al.*, 2008). Diese Variabilitätsmechanismen von *C. albicans* begründen das hohe Maß an Genominstabilität bei Stressinduktion und Selektion mit 5-

Fluoroorotsäure (Selmecki *et al.*, 2005; Wellington und Rustchenko, 2005; Wellington *et al.*, 2006).

Eine weitere genomische Besonderheit des Organismus ist eine alternative Kodon-Nutzung für das Basentriplett CUG, was hier für Serin statt für Leucin kodiert (Santos *et al.*, 1997). Bei der Herstellung von Mutantenstämmen aus den auxotrophen Laborstämmen CAI-4, BWP17 und SN148 ist auf eine Integration des *URA3*-Gens zu achten. Dieses Gen, das für eine Orotidine-5'-monophosphat-decarboxylase kodiert, ist bei diesen Stämmen deletiert und dies führt zu einer verminderten Virulenz (Navarro-García *et al.*, 2001). *URA3* ist ein Virulenzfaktor, da die Aktivität der Orotidine-5'-monophosphat-decarboxylase direkten Einfluss auf die Virulenz und die Hyphenbildung des Stammes hat (Brand *et al.*, 2004; Staab und Sundström, 2003). Durch die Deletion von *URA3* ist die Proteinaktivität 13 weiterer Proteine signifikant verändert, so dass der Purin- und Pyrimidinbasenmetabolismus, die Hämbiosynthese und der Umsatz aromatischer Aminosäuren und Translations- und Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden (Brand *et al.*, 2004). Um morphologische und virulenzabhängige Phänotypen zu charakterisieren, ist daher eine Integration des *URA3*-Markers in die zu untersuchende *C. albicans*-Mutante notwendig.

### 1.5 Flockulierung bei *Saccharomyces cerevisiae*

Flockulierung ist ein reversibler, asexueller und calciumabhängiger Prozess, bei dem es zur Sedimentation von Zellflocken innerhalb einer Kultur infolge von ausgeprägter Zell-Zelladhäsion kommt. Diese Eigenschaft spezieller *S. cerevisiae*-Stämme ist für die industrielle Anwendung, z.B. der Bier-, Wein- und Alkoholproduktion, erwünscht. Sedimentieren die Zellflocken bestimmter Braustämme nach der Fermentation am Boden, werden sie als Lager-, bei Ansammlung an der Oberfläche der Fermenterkultur als Ale-Stämme bezeichnet. Die Ausbildung von Zellflocken wird durch die Adhäsion von Zellen mit speziellen Zelloberflächenproteinen, sog. Flocculinen oder Adhäsinen, verursacht. Eine physiologische Flockulierung wird über Lektin-ähnliche Proteine, sog. Flocculine, induziert, die an Zucker- oder Peptidreste in der Zellwand angrenzender Zellen binden. Alle pilzlichen Adhäsine bestehen aus drei Domänen. Die C-terminale Domäne mit dem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anhang dient der Verankerung des Adhäsins in der Zellwand (Bony *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999). Der N-Terminus mit Kohlenhydrat- oder Peptidbindedomäne ragt aus der Zelloberfläche und vermittelt so die spezifische Bindung an Zucker- oder Peptidreste auf Oberflächen anderer Zellen (Kobayashi *et al.*,

1999; Groes *et al.*, 2002; Rigden *et al.*, 2004). Die große mittlere Domäne besteht aus serin- und threoninreichen Wiederholungssequenzen, die, aufgrund ihrer repetitiven Eigenschaft und der hohen Sequenzähnlichkeit, häufige Rekombinationen während der DNA-Replikation vermitteln. Dies führt zu einer Insertion oder einer Deletion der Wiederholungssequenz, was das entsprechende Adhäsion verlängert oder verkürzt. Daher sind die Wiederholungssequenzen für die hohe Variabilität innerhalb der Adhäsine verantwortlich (Frieman *et al.*, 2002; Verstrepen *et al.*, 2005). Flocculine werden in *S. cerevisiae* durch die *FLO*-Genfamilie kodiert, wobei hauptsächlich *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* bis *FLO11* an der Flockulierung beteiligt sind (Teunissen und Steensma, 1995). Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 führen zu Zell-Zelladhäsion, während Flo11 die Adhäsion an abiotische Substrate vermittelt (Guo *et al.*, 2000). Die transkriptionelle Aktivität der *FLO*-Gene wird durch den Nährstoffstatus und andere Stressfaktoren beeinflusst (Stratford, 1992a; Verstrepen *et al.*, 2003). Flo8 ist ein transkriptioneller Aktivator für die meisten *FLO*-Gene, wie *FLO1* und *FLO11*, und *STA1* (Kobayashi *et al.*, 1999). Vielfach sind Calcium-Ionen nötig, um eine aktive Form der Flocculine zu erlangen (Stratford, 1992b).

Das Gen *SFL1* (Suppressor of Flocculation) aus *S. cerevisiae* ist ein Transkriptions-repressor von *FLO11*, der die Genexpression durch Rekrutierung des Co-Repressors Ssn6-Tup1 inhibiert. Gene, die über Sfl1 und den Ssn6-Tup1-Komplex reguliert werden, sind *FLO11*, *HSP26* und *SUC2* (Conlan und Tzamarias, 2001; Song und Carlsson, 1998). Das Protein Sfl1 besitzt zwei Domänen, die homolog zu Myc Onkoproteinen und Hitzeschocktranskriptionsfaktoren sind (Fujita *et al.*, 1989). Eine Deletion des *SFL1*-Gens führt zu pseudohyphalem und invasivem Wachstum in *S. cerevisiae*. Die cAMP-abhängige Proteinkinase Tpk2 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor Sfl1 und inhibiert diesen dadurch. (Robertson und Fink *et al.*, 1998; Conlan und Tzamarias, 2001). Die Phosphorylierung von Sfl1 führt zu einer Inhibierung der Dimerisierung des Proteins, wodurch eine Transkriptionsrepression verhindert wird. Ebenso phosphoryliert Tpk2 das Protein Flo8, das nun an den Promotorbereich des Zielgens *FLO11* binden kann und die Transkription initiiert (Pan und Heitmann, 2002). Ebenso interagiert ScSfl1 mit Gts1, das die Expression von *FLO1* durch transkriptionelle Repression mittels Inhibierung von Sfl1 induziert (Shen *et al.*, 2006). Sfl1 aktiviert die Transkription des Gens *HSP30* unter exponentiellen Bedingungen in Glukosemedium, aber auch unter verschiedenen Stressbedingungen, wie Ethanolstress, Hitzeschock und Kohlenstoffmangel (Galeote *et al.*,

2007). *ScSfl1* ist nötig für die Mineralisierung von Kupfersulfid an der Zelloberfläche (Yu *et al.*, 1996).

### 1.6 Adhäsion bei *Candida albicans*

Adhäsion in *Candida albicans* wird durch Agglutinin-ähnliche Sequenzen (Agglutinin-like sequence, *ALS*) vermittelt, die die Adhäsion an synthetische Oberflächen und Zellen vermitteln. Diese bilden die Genfamilie der *ALS*-Gene, die aus acht Genen besteht und die für große Zelloberflächenglykoproteine, die als Adhäsine dienen, kodieren (Hoyer *et al.*, 2007). Die Genfamilie zeichnet sich durch hohe Sequenzähnlichkeit und hohe allelische Variabilität aus. Jedes *ALS*-Gen besitzt eine Drei-Domänen-Struktur, bestehend aus einer 5'-Domäne mit ca. 1300bp, die hohe Sequenzähnlichkeiten innerhalb der *ALS*-Gene aufweist, einer zentralen Domäne mit einer variablen Anzahl an Sequenzwiederholungen eines 108bp-Motivs und einer weniger konservierten 3'-Domäne. Die Gene sind auf drei der acht Chromosomen lokalisiert: *ALS1*, *ALS2*, *ALS4*, *ALS5* und *ALS9* befinden sich auf Chromosom 6, *ALS6* und *ALS7* auf Chromosom 3 und *ALS3* und *ALS8* auf Chromosom R (Hoyer *et al.*, 2007; Hoyer, 2001a). *ALS*-Gene sind ebenfalls in *Candida dubliniensis* und *Candida tropicalis*, beides ebenso humanpathogene Pilze, vorhanden (Hoyer *et al.*, 2001b). Deletionen verschiedener *ALS*-Gene in *Candida albicans* führten zu verminderter Adhärenz der Zellen an Epithelien. *ALS2*, *ALS4* und *ALS9* vermitteln die Adhäsion der *C. albicans*-Zellen an Endothelzellen, aber nicht an Epithelzellen (Hoyer *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007b). *ALS3* vermittelt zusätzlich die Adhäsion an Endothelzellen, die Adhärenz an Mundepithelzellen und an humane hypopharyngeale Plattenepithelkarzinom- (FaDu)-Monozellschichten (Zhao *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005). Eine Deletion von *ALS1* in *Candida albicans* hat keinen Effekt auf die Adhäsion an Epithelien. *ALS5*, *ALS6* und *ALS7* sind anti-Adhäsine, deren Deletion zu einer verstärkten Adhäsion an Endothel- und Epithelzellen führt (Zhao *et al.*, 2007a). *ALS1* ist als Virulenzfaktor in *C. albicans* beschrieben (Kamai *et al.*, 2002).

Ein weiteres Adhäsion in *Candida albicans* ist das Hyphen-Zellwand-Protein (Hyphal wall protein, *HWPI*). Hwp1 besteht aus einer N-terminalen Domäne, die zelloberflächenexponiert ist, und einer C-terminalen Domäne, die posttranskriptionell mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker versehen wird. Die mittlere Domäne besteht aus einer serin- und threoninreichen Sequenz, deren Aminosäurereste mannosyliert werden (Staab und Sundstrom, 1998). Das Protein lokalisiert in der Zellwand und wird



spezifisch während der Hyphenphase des Organismus, jedoch nicht in Hefezellen oder Pseudohyphen, exprimiert. Die Adhäsion von *hwp1*-Deletionsmutanten ist gestört, so dass eine Anlagerung an Epithelzellen und die Kapazität zur systemischen Infektion verringert ist. Das Gen ist ein Virulenzfaktor (Sundstrom, 2002; Staab *et al.*, 1999).

Ebenso ein Adhäsion ist das Gen *EAP1*, welches für ein GPI-verankertes Zellwand-Adhäsion kodiert, das sowohl für Zell-Zell-Adhäsion, als auch Biofilmbildung notwendig ist. Die Transkription von *EAP1* wird durch den Transkriptionsfaktor Efg1 reguliert (Li und Palecek, 2003).

### 1.7 Genfamilien in *Candida albicans*

Mit Hilfe der Genomsequenzierung von *Candida albicans* konnten verschiedene Genfamilien in dem Organismus identifiziert werden, die unter anderem in der Pathogenität eine Rolle spielen. Die Genfamilie der sekretierten Aspartyl-Proteinasen (secreted aspartyl proteinases, *SAP*)-Gene besteht aus 10 Genen, die eine wesentliche Rolle für die Virulenz von *C. albicans* spielen. Verschiedene *SAP*-Gene sind entscheidend für Schleimhautinfektionen und systemische Infektionen, sie sind involviert in die Adhäsion, die Gewebeerstörung und das Umgehen der Wirt-Immun-Antwort (Hube und Naglik, 2001).

Eine weitere Genfamilie sind die Agglutinin-ähnlichen Sequenzen (Agglutinin-like sequences, *ALS*) -Gene, die für große Zelloberflächenglykoproteine kodieren, die in den Prozess der Adhäsion an Wirtsgewebe involviert sind. Diese Gene sind verschieden durch unterschiedliche physiologische Mechanismen reguliert und zeigen eine hohe genetische Variabilität innerhalb eines Stammes oder Allels (Hoyer, 2001a).

Die Genfamilie der Phospholipasen (PLB, PLC) besteht aus drei Phospholipasen C und Phospholipase B, die in verschiedene zelluläre Prozesse involviert sind. Phospholipasen C werden nicht sekretiert und sind nötig für die Ausbildung von Hyphenzellen, allerdings spielen sie keine Rolle bei der Virulenz des Organismus (Kunze *et al.*, 2005). Die extrazelluläre Phospholipase B ist dagegen als Virulenz beeinflussend nachgewiesen (Samaranayake *et al.*, 2005). Die ATP-binde-Kassetten (ATP-binding-cassette, ABC)-Transporterprotein-Superfamilie besteht aus 28 Genen, von denen einige multiple Antimykotika-Transporter sind, so dass sie eine Rolle bei der Entstehung von Resistenzen

spielen (Gaur *et al.*, 2005). Die Genfamilie der Lipasen (LIP) besteht aus zehn Genen, *LIP1* bis *LIP10*, die während der Hefe- zu Hyphenzelltransition exprimiert sind und ebenfalls in Maus-Infektionsmodellen nachgewiesen wurden. Diese lipolytische Aktivität könnte zur Persistenz und Virulenz von *C. albicans* an Humangewebe beitragen (Hube *et al.*, 2000).

Eine weitere kürzlich entdeckte Gengruppe in *Candida albicans* ist die *TLO*-Genfamilie (van het Hoog *et al.*, 2007). Mit Hilfe eines Ein-Hybrid-Experiments in *S. cerevisiae* wurde ein putativer Transkriptionsfaktor, *CTA2*, identifiziert (Kaiser *et al.*, 1999). Diese Funktion wurde allerdings bisher nicht bestätigt. Dieses Gen und verwandte Sequenzen sind telomernah lokalisiert (Goodwin und Poulter, 2000). Diese Genfamilie besteht aus 14 beschriebenen Gensequenzen, die mit *TLO* (Telomere associated genes) bezeichnet werden. Sie sind entsprechend ihrer Anordnung auf den Chromosomen R und 1 bis 7 von links nach rechts benannt, so dass *TLO1* auf dem linken Arm und *TLO2* auf dem rechten Arm von Chromosom R liegt, usw. Ein *TLO*-Gen befindet sich nicht telomernah, sondern 1,129 Mbp vom Telomer des Chromosom 1 entfernt. Dieses Gen wurde aufgrund der abweichenden Lokalisierung mit *TLO34* bezeichnet, da es zwischen *TLO3* und *TLO4* liegt (van het Hoog *et al.*, 2007). Die Expressionsrate verschiedener *CTA2*-Gene wurde als zweifach hochreguliert in Hyphenzellen von *C. albicans* nachgewiesen (Sickinger und Wendland, unveröffentlicht).

### 1.8 Aufbau und Wirkungsweise antifungaler Substanzen

Antifungale Substanzen bzw. Antimykotika werden anhand ihrer Wirkungsweise in fünf verschiedene Klassen eingeteilt: Polyene, Azole, Allylamine, Echinocandine, sowie die Einzelsubstanzen Flucytosin und Griseofulvin (Kauffman, 2006).

Polyen-Antimykotika bestehen aus mehreren C-C-Doppelbindungen, die ringförmig angeordnet sind und eine intramolekulare Esterbindung enthalten. Sie werden daher auch als Makrolide bezeichnet. Die fungizide Wirkung entsteht durch Bindung von Ergosterin in der Zellmembran, so dass sich ein ringförmiger Kanal bildet, der die Permeabilität der Zelle für  $K^+$ -Ionen erhöht, was zum Zelltod führt. Amphotericin B, Nystatin und Natamycin gehören zu dieser Gruppierung.

Die bedeutendste Gruppe antifungaler Substanzen sind die Azole, die in Benzimidazole, Triazole und Imidazole unterteilt werden. Sie hemmen die Ergosterolbiosynthese, indem das CytochromP450-Enzym Lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase, Genprodukt von *ERG11*, kompetitiv gehemmt wird. Darüber hinaus kommt es zur Akkumulation von 14 $\alpha$ -methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, einem methylierten Sterol, das das Wachstum hemmt. Fluconazol ist das meistgenutzte Azol neben Vorikonazol und Itrakonazol.

Die Allylamine Terbinafin und Naftifin hemmen die Squalenepoxidase, ein Enzym, das durch *ERG1* kodiert wird. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Squalen zu Epoxysqualen. Durch die Hemmung von Erg11 ist die Ergosterolbiosynthese bereits im ersten Schritt behindert. Anwendung finden diese Antimykotika vor allem in der Behandlung von Nagel- und Hautpilzerkrankungen.

Zu den Echinocandinen zählen Caspofungin, Micofungin und Anidulafungin, die die Synthese von  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan und damit den Aufbau der Zellwand hemmen. Diese Lipopeptide führen so zur Zellyse und zum Zelltod. Caspofungin ist ebenso effizient wie das konventionell angewandte Amphotericin B zur Behandlung von Schleimhautpilz und systemischer Infektion mit *Candida*- und *Aspergillus*-Spezies. (Kurtz und Douglas, 1997; Derenski und Stevens, 2003).

Flucytosin (5-Fluor-Cytosin) ist ein Analogon der Nukleinbase Cytosin und daher wirkt als Antimetabolit in der DNA-Synthese von Pilzen. Die Substanz wird in der Zelle durch die Cytosin-Deaminase zu 5-Fluor-Uracil desaminiert und anschließend durch die UMP-Pyrophosphorylase in 5-Fluor-UMP umgewandelt. Das phosphorylierte 5-Fluor-UTP wird in die RNA eingebaut und bewirkt so die Synthese fehlerhafter RNA. Ebenso wirkt ein Stoffwechselprodukt, das 5-Fluor-dUMP, inhibierend auf die Thymidylatsynthase. Dadurch wird die DNA-Synthese und somit das Zellwachstum inhibiert. Die Desaminierung von 5-Fluor-Cytosin zu 5-Fluor-Uracil erfolgt in Säugetierzellen nicht oder nur in geringem Maße, daher besitzt Flucytosin eine geringe Toxizität. Ebenfalls wirkt Caspofungin hemmend auf die Zellwandsynthese. (Morschhäuser, 2003).

Griseofulvin ist ein Benzofuranderivat, das durch eine Hemmung der Chitinbiosynthese zu Defekten im Zellwandaufbau führt. Ebenfalls kommt es durch eine Funktionsstörung der Mikrotubuli zu einer Hemmung der Mitose und dem zellulären Stofftransport.

## 2. Materialien und Methoden

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Verwendete Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Für die Transformation und Amplifikation von Plasmiden diente der Stamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983). Von *Candida albicans* wurde das klinische Isolat SC5314 (Gillum *et al.*, 1984) als Vergleichsstamm für morphologische und molekulare Analysen verwendet. Für die Transformation von Disruptionskassetten und Plasmiden wurden die auxotrophen Stämme BWP17 (Wilson *et al.*, 1999), SN148 und SN152 (Noble und Johnson, 2005) und CAI-8 (Fonzi und Irwin, 1993) verwendet. Als Ausgangsstämme zur Transformation in *S. cerevisiae* dienten BY4741 und BY4742 (EUROSCARF). Alle Stämme wurden als Dauerkultur bei -80°C in Glycerinlösung (25% Glycerin in entsprechendem Medium) aufbewahrt.

**Tabelle 1: Stammliste**

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>C. albicans</i>		
SC5314	wildtyp	Gillum <i>et al.</i> , 1984
BWP17	<i>ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434/ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i>	Wilson <i>et al.</i> , 1999
SN148	<i>arg4</i> $\Delta$ / <i>arg4</i> $\Delta$ <i>leu2</i> $\Delta$ / <i>leu2</i> $\Delta$ <i>his1</i> $\Delta$ / <i>his1</i> $\Delta$ <i>ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434/ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434 iro1</i> $\Delta$ :: <i>imm434/iro1</i> $\Delta$ :: <i>imm434</i>	Noble und Johnson, 2005
SN152	<i>arg4</i> $\Delta$ / <i>arg4</i> $\Delta$ <i>leu2</i> $\Delta$ / <i>leu2</i> $\Delta$ <i>his1</i> $\Delta$ / <i>his1</i> $\Delta$ <i>ura3-iro1::imm434/URA3-IRO1</i>	Noble und Johnson, 2005
CAI-8	<i>ura3::</i> $\Delta$ <i>imm434/ura3::</i> $\Delta$ <i>imm434, ade2::hisG/ade2::hisG</i>	Fonzi und Irwin, 1993
CAI-8+ <i>SalexA</i> *	<i>RPS1/rps1::SalexA-RPS1-URA3</i>	Russell und Brown, 2005
CAI-8+ <i>SalexA-lexOP</i> *	<i>RPS1/rps1::SalexA-RPS1-URA3 ade2::hisG/ade2::OP-lacZ-ADE2</i>	Russell und Brown, 2005
CAI8- <i>SalexA-NRG1</i> *	<i>RPS1/rps1::SalexA-NRG1-RPS1-URA3</i>	Russell und Brown, 2005
CAI8- <i>SalexA-NRG1-lexOP</i> *	<i>RPS1/rps1::SalexA-NRG1-RPS1-URA3 ade2::hisG/ade2::OP-lacZ-ADE2</i>	Russell und Brown, 2005
CAI8- <i>SalexA-GCN4</i> *	<i>RPS1/rps1::SalexA-GCN4-RPS1-URA3</i>	Russell und Brown, 2005
CAI8- <i>SalexA-GCN4-lexOP</i> *	<i>RPS1/rps1::SalexA-GCN4-RPS1-URA3 ade2::hisG/ade2::OP-lacZ-ADE2</i>	Russell und Brown, 2005
CAJ043*	<i>ade2::hisG/ade2::OP-lacZ-ADE2</i>	diese Arbeit
CAJ049*	<i>RPS1/rps1::SalexA-SFL1-RPS1-URA3 ade2::hisG/ade2::OP-lacZ-ADE2</i>	diese Arbeit
CAJ066*	<i>RPS1/rps1::SalexA-SFL1-RPS1-URA3 ade2::hisG/ade2::OP-lacZ-ADE2</i>	diese Arbeit
CAJ025 <sup>†</sup>	<i>SFL1/sfl1::CmLEU2, arg4<sup>-</sup>, ura3<sup>-</sup>, hisI<sup>-</sup></i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
CAL029 <sup>†</sup>	<i>sfl1::CmLEU2/sfl1::CdHIS1, arg4<sup>-</sup>, ura3<sup>-</sup></i>	diese Arbeit
CAJ039 <sup>†</sup>	<i>sfl1::CmLEU2/sfl1::HIS1-MET3p-SFL1</i>	diese Arbeit
CAJ042 <sup>†</sup>	<i>sfl1::CmLEU2/sfl1::SFL1-GFP-CdHIS1</i>	diese Arbeit
CAJ071 <sup>†</sup>	<i>sfl1::CmLEU2/sfl1::URA3</i>	diese Arbeit
CAJ110 <sup>#</sup>	<i>ALS3/CmLEU2-AgTEF1prom-ALS3</i>	diese Arbeit
CAJ111 <sup>#</sup>	<i>ALS3/CdHIS1-AgTEF1prom-ALS3</i>	diese Arbeit
CAJ112 <sup>#</sup>	<i>ALS1/CdHIS1-AgTEF1prom-ALS1</i>	diese Arbeit
CAJ113 <sup>#</sup>	<i>ALS1/CdHIS1-AgTEF1prom-ALS1</i>	diese Arbeit
CAJ123 <sup>#</sup>	<i>ALS1/CdHIS1-AgTEF1prom-ALS1, ALS3/CmLEU2-AgTEF1prom-ALS3</i>	diese Arbeit
CAJ124 <sup>#</sup>	<i>ALS1/CdHIS1-AgTEF1prom-ALS1, ALS3/CmLEU2-AgTEF1prom-ALS3</i>	diese Arbeit
GC107 <sup>+</sup>	<i>TLO8/TLO8prom-URA3</i>	Martin, 2007
GC144 <sup>+</sup>	<i>TLO3/TLO3prom-URA3</i>	Martin, 2007
CAJ101 <sup>†</sup>	<i>TLO34/tlo34::CdHIS1</i>	diese Arbeit
CAJ107 <sup>†</sup>	<i>tlo34::CdHIS1/tlo34::URA3</i>	diese Arbeit
CAJ108 <sup>#</sup>	<i>TLO34/tlo34::CmLEU2</i>	diese Arbeit
CAJ109 <sup>#</sup>	<i>tlo34::CmLEU2/ tlo34::ARG4</i>	diese Arbeit
<b><i>S. cerevisiae</i></b>		
BY4741	<i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4742	<i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	EUROSCARF
Stammsammlung	MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> , ORF::kanMX4	EUROSCARF

<sup>†</sup> Stämme sind Derivate von SN148, \* Derivate von CAI-8, # Derivate von SN152, + Derivate von BWP17

## 2.2 Verwendete Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde 2xYT-Medium (16g/l trypt. Pepton, 10g/l Hefeextrakt, 5g/l Natriumchlorid) verwendet. Zur Selektion von Transformanten mit Plasmiden, die das Ampicillin-Resistenzgen *BLA* tragen, das für eine  $\beta$ -Lactamase kodiert, wurden dem Medium 100 $\mu$ g/ml Ampicillin-Natriumsalz (Genaxxon) zugesetzt. Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* und *C. albicans* wurden YPD (10g/l Hefeextrakt, 20g/l Casein-Pepton, 20g/l Glukose) als Vollmedium und SD- bzw. CSM-Medium (20g/l Glukose, 6,7g/l YNB w/o aa, 0,79g/l CSM oder entsprechend den Herstellerangaben [Q-BIOgene]) als Minimalmedien verwendet. Für die Selektion mit SD-Minimalmedium wurden entsprechend 100 $\mu$ g/ml Leucin, 20 $\mu$ g/ml Arginin, 20 $\mu$ g/ml Histidin, 30 $\mu$ g/ml Lysin, 20 $\mu$ g/ml Adeninsulfat und 20 $\mu$ g/ml Methionin bzw. 40 $\mu$ g/ml Uridin oder 20 $\mu$ g/ml Uracil zugesetzt. Für die Expression eines Gens mittels *MET3*-Promotor wurde CSM-Methionin verwendet und durch Zugabe von 3,5mM Methionin zum Medium konnte die Expression des mit diesem Promotor regulierten Gens reprimiert werden. Alle Zellkulturen wurden, wenn nicht gesondert erwähnt, bei 30°C inkubiert. Für die Induktion der Hyphenbildung in *C. albicans* wurden dem Medium 10% Serum (Newborn Calf Serum,

Sigma) oder 0,5g/l N-Acetyl-D-glucosamin (Roth) zugegeben und die Kulturen bei 37°C inkubiert. Eine Selektion der *S. cerevisiae*-Deletionsstämme und von *C. albicans* erfolgte mit 50mg/ml Geneticindsulfat (G418, Genaxxon). Ein Wachstumsversuch unter mikroaerophilen Bedingungen wurde mit YPS-Medium (10g/l Hefeextrakt, 20g/l Casein-Pepton, 20g/l Sucrose) durchgeführt. Für Festmedien wurden 20g/l Agar zum Medium gegeben.

### 2.3 Klonierung und Amplifikation von Plasmiden

#### 2.3.1 Isolierung und Ligation von DNA-Fragmenten

DNA Fragmente, die mittels PCR amplifiziert oder durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen gewonnen wurden, konnten mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wurden die DNA-Proben mit 1/10Vol. Probenpuffer (0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol, 0,2% Orange G, 50% Saccharose, 1mM EDTA) auf 0,8%ige Agarosegele (1g in 120ml Agarose, Roth) aufgetragen und bei 100V für 1h aufgetrennt. Als Größenstandard wurde mit *Pst*I gespaltene Lambda-DNA (Fermentas) verwendet. Entsprechende Fragmente wurden isoliert und mittels Wizard SV Gel- und PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt. Für die Ligation der PCR-Fragmente bzw. Restriktionsprodukte wurde ein 10µl-Ligationssansatz mit 3µl PCR-Fragment, 1µl Vektor (z.B. pDrive, Qiagen bzw. pGEM, Promega), 5µl 2x Ligase-Puffer und 1µl T4-Ligase (Qiagen bzw. Promega) hergestellt. Die Inkubation erfolgte für 16h bei 4°C.

#### 2.3.2 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen

Zellen des Stammes *E. coli* DH5α wurden für die Elektroporation nach der Methode von Hanahan präpariert (Hanahan, 1983). Hierzu wurde 1l 2xYT-Medium mit 10ml Vorkultur des Stammes inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 auf einem Schüttler bei 180U/min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4000U/min für 10min pelletiert (Multifuge 1 S-R, Heraeus) und in gekühltem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Zellpellet in kaltem, 10%igem Glycerin resuspendiert, erneut pelletiert und in einem Volumen 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.3.3 Transformation und Selektion von *Escherichia coli*

Durch Ligation mit PCR- bzw. Restriktionsfragmenten erhaltene Plasmide wurden mittels Elektroporation in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Hierzu wurden 5 $\mu$ l Ligationsansatz zu 50 $\mu$ l elektrokompenten DH5 $\alpha$ -Zellen gegeben und bei 2500V (Easyject Prim, Equibio) elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden in 1ml 2xYT-Medium resuspendiert und 30min bei 37°C und 300U/min inkubiert. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte auf 2xYT+amp-Agar, indem 100 $\mu$ l des Transformationsansatzes ausplattiert wurden. Für die Selektion von Integrationen in den *lacZ*-Lokus von Plasmiden wurden zusätzlich 50 $\mu$ l einer 20mg/ml X-Gal-Lösung ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 16h. Anschließend wurden Einzelkolonien für eine Plasmid-Mini-Präparation in 2xYT+amp angeimpft.

### 2.3.4 Plasmid-Mini-Präparation mittels alkalischer Lyse

Zur Überprüfung auf erfolgreiche Transformation und korrekte Integration des Fragments in den Vektor wurde eine Plasmid-Mini-Präparation mittels alkalischer Lyse durchgeführt. Dafür wurden zunächst Einzelkolonien von den Selektionsplatten in 4ml 2xYT+amp Medium inokuliert und 16h bei 37°C inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurde 1ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 13000U/min pelletiert (Pico 17, Heraeus) und in 250 $\mu$ l Lösung 1 (50mM Glukose, 25mM Tris, 10mM EDTA) resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von 250 $\mu$ l Lösung 2 (200mM NaOH, 1% SDS) und eine Inkubation für 5min bei mäßigem Schütteln, was zu einer Lyse der Zellen führte. Diesem Ansatz wurden 250 $\mu$ l Lösung 3 (3M Kaliumacetat pH 5,2) zugesetzt und 15min bei 13000U/min zentrifugiert. Für die Fällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, mit 750 $\mu$ l 2-Propanol versetzt und 30min bei 13000U/min zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und 10min in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Plus SC110A, Savant) getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde für weitere Untersuchungen in 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.3.5 Verifizierung der korrekten Fragmentintegration

Die mittels alkalischer Lyse gewonnene Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen restringiert, um eine korrekte Integration des PCR- bzw. Restriktionsfragmentes in den Zielvektor zu überprüfen. Hierzu wurden 6 $\mu$ l Plasmid-DNA mit 2 $\mu$ l Restriktionspuffer, 2 $\mu$ l BSA und 0,5 $\mu$ l je Enzym (Jena Bioscience, New England Biolabs) gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 20 $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ansatz wurde 3h bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde mit 5 $\mu$ l Probenpuffer



(0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol, 0,2% Orange G, 50% Saccharose, 1mM EDTA) versetzt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 2.3.6 Plasmid-Midi-Präparation

Eine Plasmid-Midi-Präparation eines identifizierten Stammes wurde laut Herstellerangaben mit dem Plasmid-Midi-Prep-Kit (Promega) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2 Verwendete Plasmide**

Nummer	Bezeichnung	Referenz
#200	pFA-URA3	Gola <i>et al.</i> , 2003
#201	pFA-ARG4	Gola <i>et al.</i> , 2003
#231	pFA-HIS1-MET3	Gola <i>et al.</i> , 2003
#392	pCaRHO3	Dünkler, unveröffentlicht
#425	pCaRHO3c	Dünkler, unveröffentlicht
#626	pFA-CmLEU2	Schaub <i>et al.</i> , 2006
#627	pFA-CdHIS1	Schaub <i>et al.</i> , 2006
#696	pFA-MoGFP-CdHIS1	Schaub <i>et al.</i> , 2006
#788	Clp-lexA	Russell und Brown, 2005
#790	pCR-OP- <i>lacZ</i>	Russell und Brown, 2005
#895	pClp-lexA-CaSFL1	diese Arbeit
#631	pDrive-TLO34-Promotor	diese Arbeit
#648	pDrive-TLO34-Prom500bp	diese Arbeit
#649	pDrive-TLO34-Prom250bp	diese Arbeit
#650	pDrive-TLO34-Prom250bp+ORF	diese Arbeit
#661	pDrive-TLO34-Prom1000bp	diese Arbeit
#677	pDrive-TLO34-Ap1a-P4a	diese Arbeit
#681	pLacZ2-TLO34promAP1a-P4A	diese Arbeit
#682	pLacZ2-TLO34promAP1b-P4A	diese Arbeit
#683	pLacZ2-TLO34promP3A-P2A	diese Arbeit
#684	pRS415-AgTEFp-TLO34-GFP-AgTEFt	diese Arbeit
#687	pDrive-TLO34-P3B-G4B	diese Arbeit
#688	pDrive-TLO34-P3B-P2B	diese Arbeit
#689	pDrive-TLO34-P1B-P4B	diese Arbeit
#698	pDrive-TLO34-P3A-G4A	diese Arbeit
#C84	pSK-URA3-TLOCterm	diese Arbeit
#C85	pSK+TLO8prom	diese Arbeit
#C86	pSK+TLO8prom-TUP1orf	diese Arbeit
#C87	pSK+TLO8prom-TUP1orf-URA3-TLO8Cterm	diese Arbeit
#C88	pHEIa-TLO8prom-URA3orf	diese Arbeit
#C89	pGEM-TLO8term	diese Arbeit
#C124	pCTAp-ADE2-URA3-TLO8term	diese Arbeit
#C127	pGEM-TLO3-I	diese Arbeit
#C138	pGEM-TLO8-I	diese Arbeit

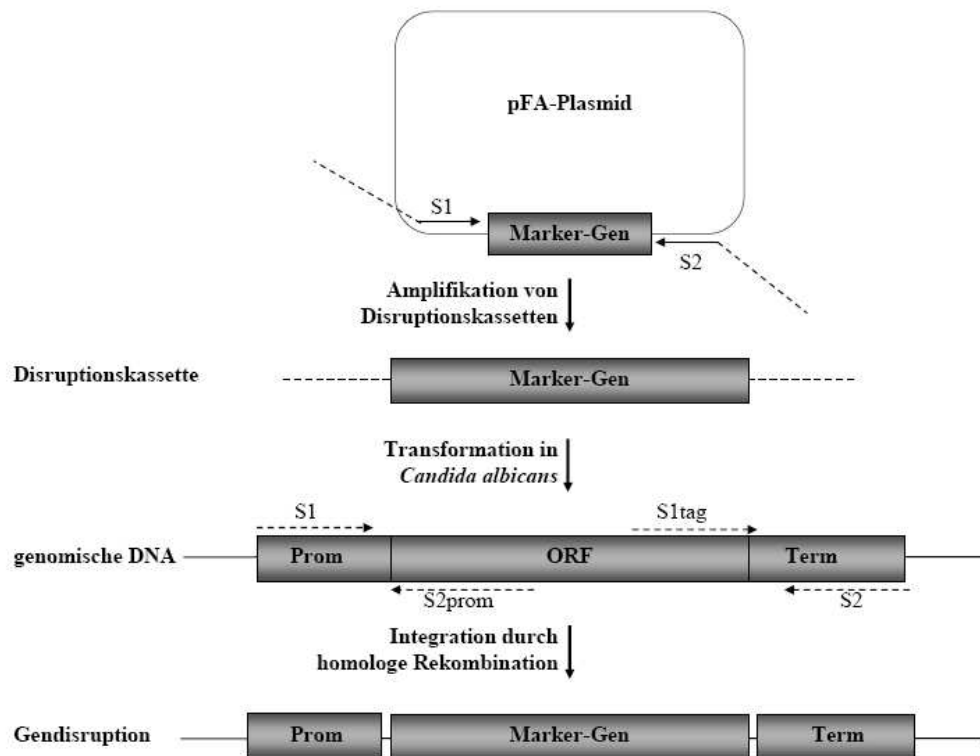
## 2.4 Deletionen und Fusionen der *Candida albicans* Gene

### 2.4.1 Analyse der genomischen Sequenz und Oligonukleotidkonstruktion

Genomische DNA- und Proteinsequenzen von *C. albicans* wurden über die Internetseiten <http://www.candidagenome.org> und <http://candida.bri.nr.ca> bezogen. Genkarten wurden mit Lasergene Software Version 7.1.0 (DNASTAR) angefertigt, ebenso wie Sequenzvergleiche und Domänenanalysen. Analog der vorgegebenen Genomsequenzen wurden Oligonukleotidprimer erstellt, die zur Amplifikation oder als Homologieregion spezifischer DNA-Abschnitte dienten. Diese Moleküle wurden von biomers.net synthetisiert. Gelieferte Oligonukleotide wurden in 10:0,1 TE-Puffer (10mM Tris, 0,1mM EDTA) resuspendiert und anschließend auf eine Endkonzentration von 2pmol mit H<sub>2</sub>O eingestellt und bei -20°C gelagert.

### 2.4.2 PCR-basierte Gendisruption in *Candida albicans*

Eine Deletion oder Fusion eines Gens in *C. albicans* wurde mittels PCR-basierter Disruptionskassetten durchgeführt (Gola *et al.*, 2003, Schaub *et al.*, 2006). Dafür wurden zunächst Markergene mittels PCR mit kombinierten Oligonukleotidprimern amplifiziert. Diese Oligonukleotidprimer weisen eine Homologieregion zur Amplifikation des Markergens und eine 100bp Homologieregion zum 5'- bzw. 3'-Ende des Zielgens auf. Diese Oligonukleotidprimer werden mit S1 und S2 bezeichnet (Abbildung 2). Für die Promotorfusion eines ORF wurde ein S2prom-Primer spezifisch für den jeweiligen Promotor, den *TEF1*-Promotor von *Ashbya gossypii* oder den *MET3*-Promotor von *C. albicans*, generiert. Für die C-terminale Fusion eines Proteins mit dem Grün-Fluoreszierenden-Protein (green fluorescent protein, GFP) wurde ein S1-GFP Oligonukleotidprimer hergestellt. Verwendete Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 3 dargestellt.



**Abbildung 2. Gendisruption mittels PCR-generierter Disruptionskassetten.**

Homolog zur stromaufwärts (upstream) und stromabwärts (downstream) untranslatierten Region des Zielgens wurden 100bp S1- und S2-Primer generiert, die am 3'-Ende eine Homologieregion zur Amplifikation des Markergens tragen. Mittels PCR wurden Disruptionskassetten amplifiziert, die für eine Transformation in *C. albicans* verwendet wurden und durch homologe Rekombination zur Disruption des Zielgens führten.

Als Markergene wurden *ARG4*, das für die Argininosuccinatlase aus *C. albicans* kodiert, *CdHIS1*, das für die ATP-Phosphoribosyltransferase aus *C. dubliniensis* kodiert, und *CmLEU2*, das für die Isopropylmalatdehydrogenase aus *C. maltosa* kodiert, verwendet. Des Weiteren diente das Gen *CaURA3*, das für die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase kodiert, als Markergen. Diese Disruptionskassetten wurden in die Stämme, BWP17 und SN148, die für die Aminosäuren Arginin, Histidin und Leucin, sowie das Nukleosid Uridin auxotroph sind, transformiert (Wilson *et al.*, 1999; Noble und Johnson, 2005). Bei der DNA-Replikation erfolgt eine homologe Rekombination der Homologieregionen mit der Zielsequenz im Genom. Das zu deletierende Gen wird dabei durch die entsprechende Markerkassette ersetzt (Abbildung 2). Durch diese Transformationsmethode konnten ebenfalls Promotorfusionen und Fusionen des Zielgens mit dem ORF für das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) erzeugt werden.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	5'-3' Sequenz*
pFAup	TTGTCGTTAGAACGCGGCTAC
pFAdown	TGCAGGTTAACCTGGCTTATC
G2-URA3	GTGTTACGAATCAATGGCACTACAGC
G3-URA3	GGAGTTGGATTAGATGATAAAGGTGATGG
G2-HIS1	CAACGAAATGGCCTCCCCCTACCACAG
G3-HIS1	GGACGAATTGAAGAAAGCTGGTGCAACCG
G2-CmLEU2	TCTAAACTGTATATCGGCACCGCTC
G3-CmLEU2	GCTGGCGCAACAGATATATTGGTG
G1-TLO34	CTCGGTCTCTATATCCTAAATACC
G4-TLO34	GTAGAGTCGTGGCATTTCGAC
M13 uni	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG
M13 rev	CACACAGGAAACAGCTATGACC
SFL1-S1	CATAACTCCAAATAAGAATAAGTTCATTTATCGCTTAAGGGAATAAGA TCAAATTATATTTGCTATTGTTTTGCCAATATCACTTTAATTTTCCACCT GCgaagcttcgtacgctgcaggtc
SFL1-S2	CCTGCTAGTGAAATATTCAATTTCTTGGAACAAACACCGCTACTCCTT ATTATATTGTTTATATCAAAGAAGAATTAGAATCAAGTTATATAGAAC Cctgatatcatcgatgaattcgag
SFL1-G1	CCAACGTTAAGTAGCCCAAGTTGC
SFL1-G4	CATTCATCGTGGTGAAGCAAGCTATGG
SFL1-I1	CCACCGACTTCTCATCCAATGGAATAC
SFL1-I2	GCAACGTTGAGGTTGGTTGTAGACG
SFL1-I3	CTTCTACTTCTGGAGCTGCAATTTTCG
SFL1-I4	GATTCCAGATGGTCTCCTCTAGAAG
RPS-veri	CGTATTCACTTAATCCCACAC
lexA-veri	GCAACTGTCAAACGC
ade2-hisG-veri	CTTTCTCATGCGTTCATGCACCAC
pCR-vector-veri	CTGGTTCTATAGTGTACCT
S2-METp-CaSFL1	GTTTTGATTGTAGGGGGTGTATGATTGGTATGTGGACTTCTTGAAGTT GGAGTAGCAGTCGTTGTCTGACCAAGTGAAGACAGTACCAAATGACTc atgttttctggggagggtatttac
S1-cMYC-CaSFL1	GAGTTTGCCACCAATCAAATCAATCAAAGATAATGATAATAAAAAACGA TAACGGTAATAGTGATGACAATGGGAACGATCATAAAAAGAGAAAAT TAGAAcggatccccgggtaattaa
CaSFL1-OH1-MluI	ggtcc <b>acg</b> ggtGGTGGAGGTCCAGGTGGAAGTCATTTGGTACTGTCTTCACT TGG
SFL1-SphI	gacat <b>gcatg</b> CTTATTCTAATTTTCTCTTTTATGATCGTTCCCATTGTCA
SalexA-I1	GACGGAGACAAAGTAATTGTTTCGAGTC
CaRPS1-I2	CAGCCATGTTGTACTTGAGTTGGATC
P5-B	tcgacaggtaccACCAATGTTGACCTAATACGCACGAC
URA3-intern-up	GCTCCCTGTTTTAATCCTTCAACC
CaSFL1-MoGFP-S1	GAGTTTGCCACCAATCAAATCAATCAAAGATAATGATAATAAAAAACGA TAACGGTAATAGTGATGACAATGGGAACGATCATAAAAAGAGAAAAT TAGAAggtgctggcgaggtgcttc
ALS1-I1	CACCACATCTCAACCTACAG
ALS1-I2	GTTGGTTGAAGGTGAGGATGAG
ALS3-I1	CGGAAATGGTCCTTATGAATCACC
ALS3-I2	CAAACCACATAACCAAGTAGAATGTTG

Oligonukleotid	5'-3' Sequenz*
HWP1-I1	CTCCAGGTACTGATTCAACTCC
HWP1-I2	CAGATGGTTGCATGAGTGGAAC
ECE1-I1	CAACATGAAGAGAGATGTTGCTCC
ECE1-I2	GACTGTCTTTCAAAGCAGATTTCAGC
HGC1-I1	CTCCGCTAACAATAACAACACTAC
HGC1-I2	GACTCCACTCATAACACTACC
DDR48-I1	CCAATGACGATGACAACCTCTTACG
DDR48-I2	CCATAGGAGTCACTGTTACCTC
ALS1prom-KpnI	gcagat <b>gggtacc</b> CTAAAGTTGCTGCAACTGAAGGGAG
G4prom-ALS1	CCATCTAAGGACCAACCCAAAACAGC
ALS3prom-KpnI	gcagat <b>gggtacc</b> GGTATGCAATTGAGATGCTTGTG
G4prom-ALS3	GCAAGTGGTAAAGTGACAGTACCCAAAGC
S1-TLO34	CTCTGGGTGTAGATGTCCCTATATATCAAGGTGGTATTTCCCTGACACA AACGTCGCATAAACCAACAAGAATAATTTTATCACACCTTTATTTCCCC CCgaagcttcgtacgctgcaggtc
S2-TLO34	GGCATTGCGACTCAAATGAAGAACAGATTGCATTACCAATTCGACTTAA ATTAGTTGGTCCATTAAGCTAACAACCTAGCTCAAATTAGTAATGTCTG ACTtctgatcatcgtgatgaattcgag
G1-TLO34	CTCGGTCTCTATATCCTAAATACC
G4-TLO34	GTAGAGTCGTGGCATTTCGAC

\*klein geschriebene Sequenzen bezeichnen pFA-annealing Regionen, fett und klein geschriebene Sequenzen bezeichnen Restriktionsschnittstellen

Die Amplifikation der Disruptionskassetten wurde mit folgendem PCR-Ansatz durchgeführt: 5µl 10xPCR-Puffer mit 15mM MgCl<sub>2</sub>, 5µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 5µl 2mM desoxyNukleotide-Mix (dNTPs: 2mM dATP, 2mM CTP, 2mM dGTP, 2mM dTTP), jeweils 5µl 2pmol Oligonukleotid S1 und S2 und 5µl Plasmid-DNA (c~20ng/µl). Dem Reaktionsgemisch wurden 0,2µl 5U/µl Taq-Polymerase (Genaxxon) zugesetzt. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Primus advanced, Peqlab Biotechnologie) durchgeführt. Das PCR-Programm wurde mit 3min. 95°C Denaturierung gestartet, gefolgt von 10 Zyklen 30sec 93°C Denaturierung, 30sec 54°C Primerhybridisierung und 3min. Elongation bei 72°C. Es folgten 30 Zyklen 30sec 93°C Denaturierung, 30sec 60°C Primerhybridisierung und 3min 72°C Elongation. Anschließend erfolgte eine Endsynthese von 8min bei 72°C. Das PCR-Produkt wurde über eine Fällung mit 1/10 Vol. 3M Natriumacetat (NaAc, pH 4,8) und 1 Vol. 2-Propanol für 30min. bei 13000 U/min pelletiert und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde 5min in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Plus SC110A, Savant) getrocknet.

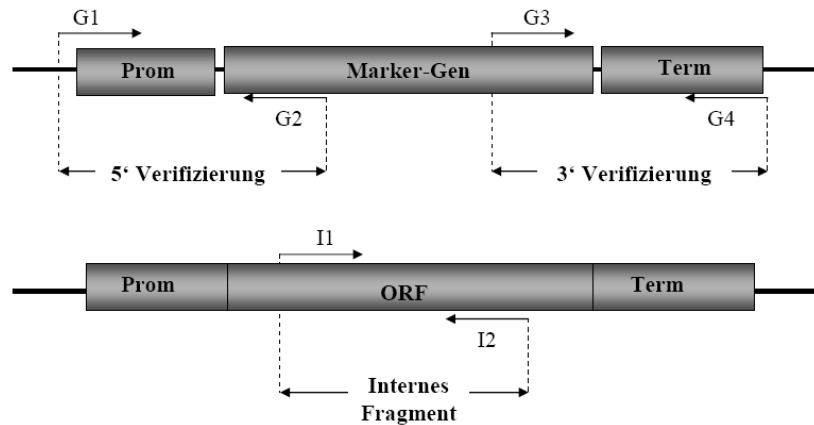
### 2.4.3 Transformation von *Candida albicans*

Mittels PCR amplifizierte Disruptionskassetten wurden durch Elektroporation in *C. albicans* transformiert (Köhler *et al.*, 1997). Hierzu wurden die Stämme BWP17, SN148 und CAI-8 verwendet (Tabelle 1), die Auxotrophien für die Aminosäuren Arginin, Histidin und Leucin, die Purinbase Adenin, sowie dem Nukleosid Uridin tragen. Die Stämme wurden für die Elektroporation vorbereitet, indem aus einer stationären Kultur eine 50ml Kultur in YPD mit einer optischen Dichte von  $OD_{600}=0,3$  für 4h bei 30°C und 180U/min (Innova44, New Brunswick Scientific) angezogen wurde. Diese Zellen wurden 10min bei 4000U/min (Multifuge 1 S-R, Heraeus) pelletiert, gewaschen und in 40ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 5ml 1M Lithiumacetat und 5ml 10xTE (100mM Tris, 10mM EDTA) für 45min bei 30°C und 180U/min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1ml 1M Dithiothreitol (DTT) für weitere 15min Inkubation. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, zweimal gewaschen und in 20ml kaltem 1M Sorbitol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C wurden die Zellen in 1Vol. 1M Sorbitol aufgenommen und jeweils 50µl dieser Suspension für die Elektroporation verwendet. Dazu wurden die zuvor gefällten Disruptionskassetten in 10µl H<sub>2</sub>O resuspendiert, mit den kompetenten Zellen in gekühlte 2mm Küvetten überführt und bei 1800V (Easyject Prim, Equibio) elektroporiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend in Minimalmedium aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Selektion der erhaltenen Transformanten erfolgte auf SD- bzw. CSM-Minimalmedium, das die Aminosäuren bzw. die Purinbase oder das Nukleosid, für die ein entsprechendes Markergen in den auxotrophen Stamm integriert wurde, nicht enthielten.

### 2.4.4 Verifizierung der *Candida albicans*-Mutanten

Die Integration des Markergens am Ziellokus wurde mittels Kolonie-PCR überprüft, indem direkt von Zellen PCR-Fragmente amplifiziert wurden, die die Insertionsstelle beschreiben. Hierzu wurden Oligonukleotidprimer homolog zur 3' und 5' untranslatierten Region des Ziel-ORF, G1 und G4, ebenso wie markerspezifische Primer, G2 und G3, generiert (Abbildung 3). Als Ausgangsmaterial für die PCR dienten 24h alte Kolonien, die in 50µl H<sub>2</sub>O überführt, für 10min auf 95°C erhitzt und schließlich bei -20°C eingefroren wurden. Von dieser Zellsuspension dienten 5µl als Ausgangsmaterial für die PCR. Der PCR-Ansatz wurde, wie in Absatz 2.4.2 beschrieben, angefertigt. Das PCR-Programm bestand aus 2min initialer Denaturierung, gefolgt von 40 Zyklen 30sec 93°C Denaturierung, 30sec 56°C Hybridisierung und 1min 72°C Synthese und einer Endsynthese von 10min bei 72°C.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden zur Größenbestimmung mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.3.1).



**Abbildung 3. Verifizierung der *Candida albicans* Mutanten.**

Die korrekte Integration der Disruptionskassetten wurde über Kolonie-PCR verifiziert. Dabei werden Fragmente mit den Oligonukleotidprimer G1 gegen G2 und G3 gegen G4 amplifiziert, die jeweils den Übergang von genomischer Sequenz zum integrierten Marker nachweisen. Zur Bestätigung einer vollständigen Disruption eines ORF wurden interne Oligonukleotidprimer für die PCR verwendet, die homolog zum Ziel-ORF sind. Im Falle einer Nullmutante liefert diese PCR kein Fragment.

#### 2.4.5 Isolierung genomischer DNA aus *Candida albicans*

Für die Verifizierung und Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde aus dem Stamm SC5314 und den mutanten Stämmen genomische DNA isoliert (Hoffman und Winston, 1987). Hierzu wurden 50ml einer exponentiellen Kultur 10min bei 4000U/min in einem 50ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert, gewaschen, in 500µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 200µl Glasperlen-Puffer (2% TritonX-100, 1% SDS, 100mM NaCl<sub>2</sub>, 10mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA), 200µl Phenol und 0,3g Glasperlen (0,45-0,52mm) zugesetzt und 3min auf dem Vortex geschüttelt. Zu dieser Lösung wurden 200µl TE 50:20 (50mM Tris, 20mM EDTA) gegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und 5min bei 13000U/min (Multifuge 1 S-R, Heraeus) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA gefällt, indem die Lösung mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (NaAc, pH 4,8) und 1 Volumen 2-Propanol versetzt, gemischt und 30min bei 13000U/min zentrifugiert wurde. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und 5min in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Plus SC110A, Savant) getrocknet. Das Pellet wurde in 400µl 50:20 TE (50mM Tris, 20mM EDTA) resuspendiert und mit 100µg RNase A (Promega) versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine erneute Fällung und schließlich wurde die genomische DNA in 50µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Für die PCR wurde

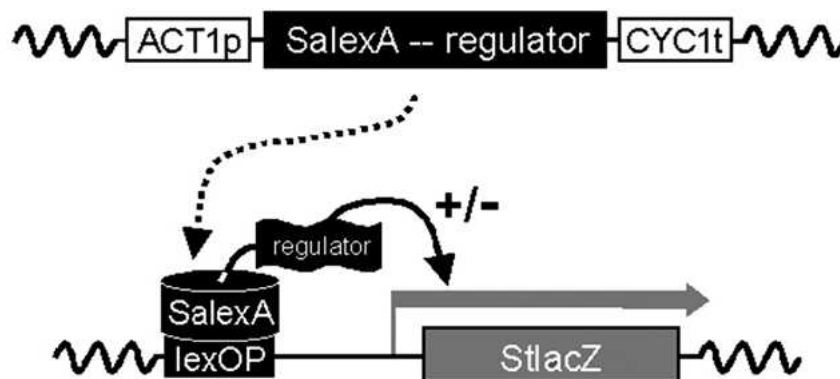
eine 1:20 Verdünnung der genomischen DNA hergestellt und davon 5µl in einem 50µl Reaktionsansatz verwendet.

## 2.5 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Erhaltene Deletions- und Promotorfusionsmutanten wurden an einem Axio Imager M1 (Zeiss) mikroskopiert. Die Zellen wurden hierfür in YPD- bzw. Minimalmedium bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen und direkt mikroskopiert. Hypheninduktion erfolgte durch Zugabe von 0,5g/l N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc, Roth) und Inkubation bei 37°C für 4-6h. Kernfärbungen wurden durch Zugabe von 1µl 10mg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma, in EtOH) zu 100µl Zellkultur durchgeführt. Für den Nachweis eines GFP-Signals wurde eine Halogenlampe mit dem Filter mit 489nm und für den Nachweis des DAPI-Signals ein Filter mit 348nm genutzt. Die Archivierung und Bearbeitung der Mikroskopbilder erfolgte mit Metamorph Software Version 7.0r4. Fotografien von Kolonien wurden mit einer Canon PowerShot G5 durchgeführt.

## 2.6 Ein-Hybrid-Assay

Der Ein-Hybrid-Assay dient dem Nachweis der Funktion eines Proteins als Transkriptionsfaktor (Russell und Brown, 2005). Hierzu wurden *C. albicans*-Mutanten mittels gezielter Plasmidintegration generiert. Die Plasmide tragen den *Staphylococcus aureus* *lexA*-ORF, der mit dem Ziel-ORF fusioniert wurde, sowie das *lacZ*-Reportergen von *Streptococcus thermophilus* mit einer Promotorregion, die die *SalexA*-Operator Sequenz TACTGTATATATATACAGTA enthält (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Schematische Darstellung des Ein-Hybrid-Assays.**

Der *Staphylococcus aureus* *lexA*-ORF wurde mit dem Ziel-ORF fusioniert und in *C. albicans* transformiert. Das fusionierte *lexA* bindet an die Operator-Sequenz im Promotor und initiiert die Transkription des Reportergens *lacZ*. Das Fusionsprotein beeinflusst die Expressionsrate entsprechend seines Transkriptionsinitiations- oder Repressionsverhaltens (Russell und Brown, 2005).



Zunächst wurde das Plasmid pClp-lexA-CaSFL1 generiert. Hierzu wurde der *SFL1*-ORF mittels PCR mit den Oligonukleotiden CaSFL1-OH1-MluI und SFL1-SphI amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *MluI* und *SphI* (New England Biolabs) restringiert und in den Vektor pClp-SalexA ligiert. Für die Transformation in *C. albicans* und die Integration in den *RPS1*-Lokus wurden das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *StuI* linearisiert. Das Plasmid pCR-OP-lacZ wurde mit *BamHI* linearisiert und homolog in den mit HisG deletierten *ADE2*-Lokus integriert. Beide Plasmide wurden mittels Elektroporation (Abschnitt 2.4.3) in den *C. albicans*-Stamm CAI-8, der Auxotrophien für Adenin und Uridin besitzt, transformiert. Als Selektionsmarker dienten das *URA3*-Gen auf dem Plasmid pClp-lexA-CaSFL1 und das *ADE2*-Gen auf dem Plasmid pCR-OP-lacZ. Der Nachweis der Integration erfolgte mittels Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden RPS-veri gegen lexA-veri, sowie ade2-hisG-veri gegen pCR-vector-veri.

Für eine qualitative Analyse der Transkriptionseffizienz wurde eine Überschichtung von Kolonien mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) vorgenommen. Hierfür wurden zunächst 3  $\mu$ l einer exponentiellen Kultur auf Festmedium getropft und für 24h bei 30°C inkubiert. Die Überschichtung erfolgte mit X-Gal-Überschichtungslösung (0,5% Agarose, 0,5M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 6% DMF, 0,1% SDS und 0,1 mg/ml X-Gal). Die Überschichtung wurde für 12h bei 30°C inkubiert.

Eine quantitative Analyse der LacZ-Proteinexpression wurde mittels eines ONPG-Assays (Miller, 1972) durchgeführt. Die exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert zugesetztes o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid zu Galaktose und den gelben Farbstoff o-Nitrophenol. Hierzu wurde die optische Dichte einer exponentiellen YPD-Kultur auf  $OD_{600}=0,5$  eingestellt. Ein Volumen von 2ml dieser Kultur wurde abzentrifugiert, gewaschen und in 300  $\mu$ l Z-Puffer (60mM  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 40mM  $Na_2HPO_4$ , 10mM KCl, 1mM  $MgSO_4$ , 50mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,0) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zu 100  $\mu$ l aliquotiert und 3min in flüssigem Stickstoff inkubiert und anschließend 1min bei 37°C aufgetaut. Der Suspension wurden 160  $\mu$ l ONPG-Lösung (4mg/ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid in Z-Puffer) zugesetzt und diese für 30min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 400  $\mu$ l 1M  $Na_2CO_3$  gestoppt. Die Farblösung wurde im Spektrophotometer bei 420nm und 550nm gemessen und daraus die Miller-Einheiten mit folgender Formel berechnet:

$$A_1 = \frac{1000 \cdot (OD_{420} - 1,75 \cdot OD_{550})}{t \cdot V \cdot OD_{600}} \text{ [Miller-Einheiten]}$$

t = Inkubationszeit in min

V = Ausgangsvolumen in ml

## 2.7 RNA-Isolierung und RT-PCR

Zum Vergleich der Genexpression hyphenspezifischer Gene in den Stämmen SC5314 und CAJ071 *sflI/sflI* wurde jeweils total RNA aus einer exponentiellen Zellkultur isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Für die Isolierung von total RNA wurden Zellen einer exponentiellen 50ml Kultur in einem 50ml Reaktionsgefäß 10min bei 4000U/min bei 4°C abzentrifugiert, mit kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1ml Denaturierungslösung (Promega) resuspendiert, mit 1/10 Volumen 2M Natriumacetat pH 4,0 (Promega) versetzt und zu 500µl in 2ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Durch Zugabe von in Säure gewaschenen Glasperlen und 3maligem Schütteln auf dem Vortex für 30sec wurden die Zellen lysiert. Für die RNA-Extraktion wurden 500µl 25:24:1 Phenol:Chloroform:IAA (AppliChem) zugesetzt, gemischt und 15min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend für 20min bei 14000U/min und 4°C (Microcentrifuge 157.MP, OLE DICH Instrumentmakers APS) zentrifugiert, die obere, wässrige Phase in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol:Chloroform:IAA-Lösung extrahiert. Die RNA wurde mit 1 Volumen 2-Propanol 2h bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation für 10min bei 14000U/min bei 4°C pelletiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Plus SC110A, Savant) getrocknet. Es folgte eine Resuspendierung in 100µl H<sub>2</sub>O. Die RNA wurde mittels Spektrophotometer (Nanodrop) bei OD<sub>260</sub> quantifiziert und deren Qualität mittels der OD<sub>230</sub> und OD<sub>280</sub> ermittelt.

Die Synthese von cDNA wurde mit reverser Transkriptase (ThermoScript, Invitrogen) durchgeführt. Hierzu wurden 5µg total RNA mit 1µl 50µM Oligo(dT)<sub>20</sub> und 2µl 10mM dNTPs versetzt, mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 12µl eingestellt und 5min bei 56°C erhitzt. Es folgte die Zugabe von 4µl 5-fach DNA-Synthese-Puffer, 1µl Ribonuklease-Inhibitor, 1µl 0,1M DTT, 1µl 15U/µl Reverse Transkriptase und 1µl H<sub>2</sub>O. Die Synthese wurde bei 50°C 1h durchgeführt. Für die RT-PCR wurden je 50µl PCR-Ansatz 2µl cDNA eingesetzt. Das PCR-Programm beinhaltete eine initiale Denaturierung bei 94°C für 2min, gefolgt von 40 Zyklen bei 94°C für 15sec, 55°C für 30sec und 72°C für 1min. Es folgte eine Endsynthese bei 72°C für 5min.

## 2.8 Selektion der *TLO*prom-*URA3*-Fusionsmutanten mit 5'FOA

Bei dem Test der Genstilllegung der telomernahen ORFs, den *TLO*-Genen, wurden die Promotoren der Gene *TLO3* und *TLO8* mit dem *URA3*-ORF fusioniert. Hierzu wurde der Promotor von *TLO3* mittels PCR-generierter Markerkassetten mit dem *URA3*-ORF fusioniert, so dass der Stamm GC144 *TLO3/TLO3*prom-*URA3* entstand. Für die Promotorfusion von *TLO8* wurde das Plasmid pDrive-*TLO8*prom-*URA3* kloniert, linearisiert und in den auxotrophen Stamm BWP17 transformiert. Hierbei entstand durch homologe Rekombination der Markerkassette an den Promotorbereich des Zielgens der Stamm GC107 *TLO8/TLO8*prom-*URA3*. Beide Mutanten wurden durch Kolonie-PCR auf korrekte Integration des *URA3*-ORF getestet (Martin und Wendland, unveröffentlicht).

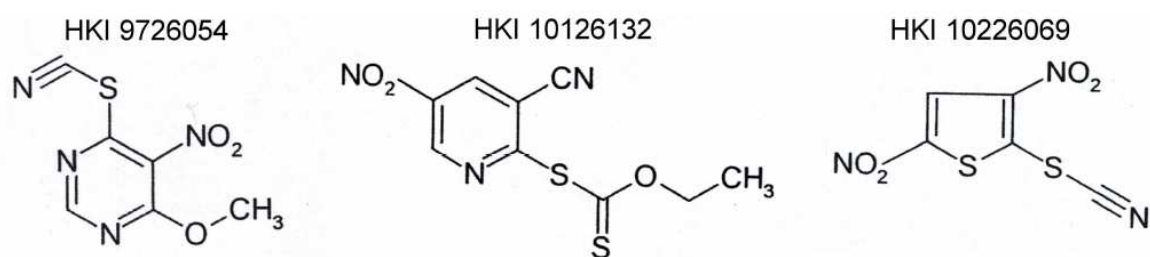
Diese Stämme wurden zunächst auf Resistenz gegenüber der Substanz 5-Fluoroorotsäure (5-FOA, Fermentas) getestet, da diese Substanz Zellen mit einem intakten *URA3*-Gen, das für die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase kodiert, abtötet. 5-FOA wird von Zellen mit intaktem *URA3* zu 5'-Fluorouracil umgewandelt, welches toxisch ist (Kaiser *et al.*, 1994; Bartel und Fields, 1994). Hierzu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe bis  $1 \cdot 10^{-4}$  einer exponentiellen YPD-Kultur mit  $OD_{600} \sim 0,5$  angefertigt und jeweils 100  $\mu$ l auf SD-Festmedium mit und ohne Zusatz von 40  $\mu$ g/ml Uridin und 50mg/ml 5-FOA ausplattiert. Die Kulturen wurden 24h bei 30°C inkubiert und selektierte, nicht *URA3*-exprimierende Kolonien anschließend auf SD-Medium ohne Uridin übertragen, um eine wiederhergestellte/erneute Expression des *URA3*-Gens zu selektieren. Die Zellen wurden erneut 24h bei 30°C inkubiert und der Vorgang wiederholt.

## 2.9 Herstellung der *TLO34*-Deletionsmutante

Eine Deletionsmutante des Gens *TLO34* (Kaiser *et al.*, 1999; van het Hoog *et al.*, 2007) wurde mittels PCR-vermittelter Gendisruption hergestellt. Für die Amplifikation der Disruptionskassetten wurden die Oligonukleotide S1-*TLO34* und S2-*TLO34* (siehe Tabelle 3) verwendet. Beide Allele des Gens wurden mit Disruptionskassetten mit den Markergenen *URA3* und *CdHIS1*, sowie *ARG4* und *CmLEU2* deletiert (siehe 2.4.2). Die Deletion des Gens wurde mittels Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden G1-*TLO34* und G4-*TLO34* und den entsprechenden internen Markeroligonukleotiden verifiziert (siehe 2.4.4).

## 2.10 Testung antifungaler Substanzen

Für die Testung der antifungalen Substanzen HKI-Nr. 9726054, 10126132 und 10226069 wurde eine Deletionsstammbank von *S. cerevisiae* auf Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber diesen Substanzen getestet. Die Substanz HKI-Nr. 9726054 gehört zur Gruppe der Rhodanopyrimidine. Das sind organische, heterozyklische Verbindungen mit aromatischen Eigenschaften und zwei Stickstoffatomen in der Ringstruktur. Zusätzlich enthält diese Struktur die Rhodanverbindung -SCN. Die Substanz HKI-Nr. 10126132 ist ein Xanthogenatopyridin. Es ist ebenfalls eine heterozyklische, aromatische Verbindung, allerdings mit nur einem Stickstoffatom in der Ringstruktur. Des Weiteren besitzt diese Substanz die Xanthogenatogruppe R-O-CSS-R, ein Salz oder Ester der Dithiokohlensäure. Dies ist ein Kohlensäurederivat, bei dem zwei Sauerstoffatome durch Schwefelatome ersetzt sind. Die Substanz HKI-Nr. 10226069 ist ein Rhodanothiophen, eine organische, heteroaromatische Verbindung mit einem Schwefelatom im Fünfring. Hier ist ebenfalls eine Rhodangruppe -SCN vorhanden (Abbildung 5). Diese antifungalen Substanzen besitzen eine gelbliche Färbung und sind in DMSO löslich.



**Abbildung 5. HKI-Substanzen mit antifungaler Wirkung**

Die Substanzen mit der Bezeichnung Nr. 9726054, 10126132 und 10226069 gehören zur Gruppe der Rhodanopyrimidine. Sie haben eine antifungale Wirkung.

Zum Nachweis der antifungalen Wirkung der Substanzen wurde ein Hemmhoftest mit *Candida albicans* durchgeführt. Hierzu wurden 10µl einer exponentiellen Kultur des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314 mit einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub>=0,3 in 5ml 1% Agar auf SD-Festmedium ausgebracht und mittig ein Whatman-Filterplättchen mit 1µg der Substanz in DMSO hinzugegeben. Die Zellen wurden 24h bei 30°C inkubiert.

Des Weiteren wurden die minimalen Hemmkonzentrationen dieser Substanzen bestimmt. Hierzu wurden jeweils 50µg/ml der Substanzen in einer 1:2-Verdünnungsreihe in einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit YNB+CSM-Medium verdünnt und mit 10µl von Kulturen der Stämme *S. cerevisiae* BY4741 und *C. albicans* SC5314 mit einer optischen Dichte von

OD<sub>600</sub>=0,1 versetzt. Diese wurden für 24h bei 30°C und 400U/min auf einem Inkubationsschüttler (TiMix 5, Edmund Bühler) inkubiert. Die niedrigste Substanzkonzentration, bei der kein Wachstum der Zellen mehr möglich ist, wird als minimale Hemmkonzentration bezeichnet.

Für die Testung der Sensitivität bzw. Resistenz der *S. cerevisiae*-Deletionsstämme gegenüber den Substanzen wurden diese in zweifacher (resistente Stämme) und halber minimaler Hemmkonzentration (sensitive Stämme) eingesetzt. Diese Deletionsstammbank besteht aus 4867 Deletionsmutanten des haploiden *S. cerevisiae*-Stammes BY4741, die in 52 96-Loch Mikrotiterplatten aufbewahrt und kultiviert wurden. Die Gendeletionen wurden durch Integration des kanMX4, dem Kanamycinresistenzgen *NPT1*, hergestellt (EUROSCARF). Es wurden Testungen dieser Deletionsstämme durch Zugabe von 10µl einer 24h Vorkultur aus einer 96-Loch Mikrotiterplatte zu 100µl Substanzlösung mit definierter Konzentration in YNB+CSM-Medium in eine frische 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben. Es folgte eine Inkubation für 24h bei 30°C und 400U/min auf einem Inkubationsschüttler. Stämme, die bei zweifacher minimaler Hemmkonzentration Wachstum aufwiesen, wurden als resistent bezeichnet, Stämme die kein Wachstum bei halber minimaler Hemmkonzentration zeigten, als sensitiv. Die identifizierten Stämme wurden isoliert und nochmals auf Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber den entsprechenden Substanzen nach oben beschriebener Verfahrensweise getestet. Die somit zweifach identifizierten *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten wurden entsprechend ihrer Reaktion auf die jeweilige Substanz aufgelistet.

### 2.11 Schweinedarmepithel-Assay

Der Schweinedarmepithel (PIE, porcine intestinal epithelium) -Assay wurde zur Überprüfung der Wirkung der Substanz HKI-Nr. 9762047 am Gewebe mit Zellen des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 verwendet (Wendland *et al.*, 2006). Hierzu wurde zunächst Blinddarmepithel vom Schwein in Ringer-Lösung (9g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 0,2g/l CaCl<sub>2</sub> 0,1g/l CHNaO<sub>3</sub>; 1g/l Glukose) mehrmals gewaschen und in ca. 50cm<sup>2</sup> große Gewebestückchen geteilt. Eine 16h alte *C. albicans* SC5314 Kultur in YPD wurde mit H<sub>2</sub>O auf eine optische Dichte von OD<sub>600</sub>=0,3 eingestellt und 1ml dieser Kultur vorsichtig auf das Darmepithel gegeben. Die Substanz Nr. 9762047 wurde in DMSO gelöst, verdünnt und mit der Zellkultur auf eine Endkonzentration von 50, 100 und 200µg/ml eingestellt. Das inokulierte Schweinedarmepithel wurde für 6h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert.

Anschließend wurde das Epithel mit 10ml Ringer-Lösung gewaschen. Diese Waschlösung wurde  $1:10^4$  verdünnt, jeweils 100µl auf YPD+G418 ausplattiert und für 24h bei 30°C inkubiert. Anhand der gewachsenen Kolonie konnten die koloniebildenden Einheiten (KBE) in der Waschlösung bestimmt werden.

### 3. Ergebnisse

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Funktionsanalyse von *SFL1* in *Candida albicans*

##### 3.1.1 Identifizierung und Sequenzvergleich des *Candida albicans* *SFL1* Gens

Die Suche nach einem homologen Gen zu *SFL1* aus *S. cerevisiae* in der Genomdatenbank von *C. albicans* (www.candidagenome.org) resultierte in dem offenen Leserahmen (open reading frame, ORF) 19.454. Dieser ORF hat eine Identität mit dem *ScSFL1*-ORF von 23% (Abbildung 6).

ATGAGTCTATTGGTACTGTCTTCACITGGTACGACACGGCTCTACTCCAACTTCAGGAGTCCGATACCACTCTGACAGCCCTTCAGTCAAAATCTATCAGCTT	<i>C. albicans</i> orf19.454
ATGAGTGAAGAGGAAGGATCTCA---GGCCGCTCCAGCTCTACCCGGCCCGGCTGGAAACGATGTACGATGCTGGTGGGCA--GCAGTGGAAATGCTATGCTG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
CAATGCAAGCTCTCCGTTCTAGATTACGTAAGTTCGACACACATGATTCAGCTATAGATATGATGCGAAACAGATATTAAATCAAAABAA	<i>C. albicans</i> orf19.454
GTGCTGAGGCGGGGCGCTGCGAGGAT---GTTAA---GAGAGTGGTCCGAGATGCTAGTGGGGG--CAGG--CGCCACAAATGCGATATTCA--TCCATAAGCT	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
GCACAGATACTTTCTAGGAGACCATGGAATCAAGCTTCTAGTATTAGTGGCCAGGGGACAACTACAGAAACATACACGTTAGTAAACATTTAC	<i>C. albicans</i> orf19.454
ATCCAGA---TTCTGGAGGA---CGATTCG---CTACACGACTTGTAT--GGTGGAGCCCTTCGGG---TTATCCT---TCATGATTAGCTGTGG--AACGGTTTAGT	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
GGGGAAATCTCAATTTGTTTTTATC--CACAATTTATGACCTTTGATGACCGATGATCC--CTCTTTATGGTGGTTCCAAGTTTGGATTCATTTATGTAAC	<i>C. albicans</i> orf19.454
AGGCTTTTGTACTCTTTCTCACTACTAATTTAAGA--GCTTTGTAGACGTTGATATTACGCTTTTACAA--GGTGC---GTTGA--TCATAGCA--GAAG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
GGCAGGAGAAAGTTTTCTGAGTGTGTGCCAATTTTCAGGACACAAATATTCATATTTTAAGCAATTAACATGTATGATTCCTAAAGTAAATGGGCAAT	<i>C. albicans</i> orf19.454
AGC--GCTAATAGTGGGCGAGCGCCATCTAATGTGACAGCA--ATCTGACGTTGATATGAT--GGCAACAAACGATASTGGGGRCG--AAATACCGTGGCGG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
TTTTAAACCAAGACATCAACACCAACCAATTCATCAAAATAGTGGGAATTTAGCACTTTTCAAGCAATTTAGAAAGG--GACATGATTCGTTAAAGAT	<i>C. albicans</i> orf19.454
TTT---CCAGA-----A--AAGGAGAAAGTAA--CCCACTAAAT--CTGGGAATTTAGCATGTTCTGGTATTTTAAAGAGGTGACATTGAGCGATCAACAC	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
ATTAACCGAAGAGTCTCAAG--AGATTGATGCGCAAGAGAGTGTCAATATATAAATTTTAGACAGA--CTTCT--CATC--ATGAGATTCACAAATGG--TACTCTT	<i>C. albicans</i> orf19.454
ATTAAGCAAGAGCTTCTTCGCTATTTACTCTCAATTACAGTGG--AA---AGAATTTAGTATCAAACTACATATATAT--CCGGTCAAGAGTAA--AC--CTG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
ATCAATGAGAGTGTGCTCATTTTGTGTCACTCCACGATTAACACCCATGCAATTCCTGTGACATGASACCTCTTCTCTCTTACTCTATACCATATGCA	<i>C. albicans</i> orf19.454
TTGAT--TCAAGAGC--GGTCAACAGTTT--CATTTCTTTGGTATTTTGGTTCGCAATTTCCGGGCCA--ATATCTCTTCTCCGGGTACTTTTATATCTCTTAG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
CCATTAGACACAGCAACAGCAACAGCAGCGAGCAGCAGCGCACTCCCTTCCAGG--GTGACCTATGSCCAGCTGTTTTTGGAGCAATTTG	<i>C. albicans</i> orf19.454
TTAGT--TACGAAATCCGATACCATCTC--CCGCTGGATTC--CATATCC--CGGAA-----TGCAGAGCAAAAGATCTCCGAACT--TTCAAGTGAACCA--TGA	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
ACCAATGCGGTGAATCAATTCAGAGAGTATCTTACAGAGCATCATATTTTAAACAAATGSCAAGATCTTTTGAATGCTACAAATTTTAAAGTTTGTGAATTA	<i>C. albicans</i> orf19.454
ATCAITTTAAGAAATTAATTTTGATATG-----TTA--AGATTATGAGTTATGCGAGCTTTCA--ATCTTT--CCAA-----CACAGTTTTT--GTTACAGATTTC	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
CTATCAATTAATCTATTGCGAAATGATTTTTTTTACATGAATAATCGATGTGATCTTCAAAATGAGCTTAAGTACCAACAGCGAATTCATGCGAGTTTGGAA	<i>C. albicans</i> orf19.454
AGCTTCAAG--AATGTAACCAAGAAATAT-----CGGAATAA--TCC--TGAAGGATCAACCAAGCAATCTAGG--ATTGCAAGGCA-----TATGTTAACTTTCAAA	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
ATTCTTCAAGAAATGTCTAATGACACAGATTCGACTGATTTACAGCATTTTGAATAATGGTGGAGGCAAGCAATGCAAAAGTTAAATATCATGTTTATTCCTCAACA	<i>C. albicans</i> orf19.454
CACGAGTGA--TTGTGAGGCCCCACGTAATATAGTCTCTTTGTGCTCTAATATGCTCGGTA--CCGCTGCT--TGTGCG--CTGTA--CCCGGCG--GAGTCCACA	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
ATCAACCTTTGCACCATATACAGCAACAGCAACCAAGACAGGATGATCTGTGTTCTTCAACATATCTCTGAGTCAAGTA--ATGTTT--GGGATTCGCTCT	<i>C. albicans</i> orf19.454
TTGCA--TTTGCC--CATATCTCATGTATG--GATGATGTTCTCCAGGGAACCGTGTATGCGGCAAGATCTGCTTCAGCAAGACATCCCTTCGAGATTCAAC	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
ACAACCAAGCTCAAGTTGC--TTCTCAACCATACCTTTGACCC-----TCACTATCAATTTATGCAACATCGTGGCTGCGGAGITCAGAAATTAATAA--GG	<i>C. albicans</i> orf19.454
GGCTTCAAGCTCGCCCTCGCACTTTTGTACATACCAACCGCAGTGGCAACCAATGTGATTTATGCGAGCGAAGCGGAC--ATGTA--CCACACTTTATTAATCAG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
TTTCTCGGTGACGCTGACAGCTATTAATTAAGAGACATTTCTGTGTTATGACCAT--TGCAAG--GAGTACCTCTGGAATAGCTCGAGATCTTTATGAGAG	<i>C. albicans</i> orf19.454
CGTTACCGTCA--ACACTACTCTCAAAATGCGAGACTTTTAGCTCTCAATATGATGCAATCTCTTTGCTCGAAATATACACAAAGGGGCAACAG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
TCACACCAAT--CACCCCTCAATTTTACCTGACACACGTCAGTCAACATGCAAGTTCAATGG--GGCCGCAATGCCACCCAAAGTTTCGCAACGAGC	<i>C. albicans</i> orf19.454
AGAGACCAATGTGTTCTCTGAGCCCGGACTCG--CAGCGAGTGTGGAGTTCAAGGTCACTAATATCCCTTCATCA--ATTTAATCTCTGCTCTGAG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
CGAATCACTTACTCTTCATGAGTCTGCTGAGT--AATAATGCAATTTTAAATTAAGGCCCGACACATA--AATCAITCACTATGTTTCAACAG--ACAAAA	<i>C. albicans</i> orf19.454
AGAACTAGCTGTGCTCAAAATGCGCTCGAGTCCATATATG--TATTAATTAACCAAGACGATTTGTATTTCTCAACCAAAATGAGAGT--TGGGTCTACAAG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
GGAG--GCGAG--CAAGACTAATGACAGTTCTGTGCGCAACATCTCATCTCTTCCAGTACAGAA--CACTTCTGCAAGAACACCAAGCAACAGCAAACTTA	<i>C. albicans</i> orf19.454
TTTTTGGCCACGATAG--AAGACAGCTCTTTAAGCTGCAACAGATCATCTGTT--ATGTA--AGATGCTCTATGCCAAGCTAGAACTCTCTCAAAATCG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
CATCATCTCAACATGCTATCTGCAATCACTCATTAACCTTATCCCGTTCAGAAACACCCAGCCCTGATCTCTATTTATGCAAGTAAATTTATCAATCTTA	<i>C. albicans</i> orf19.454
TATT--TGGGCACT--CTTTATCTCTCTTTTACATAGTTGCAACATTCAG--CTCCCAATTCGCTACTCTCAGAGGATGCTGCTCTCTTAAACAAAGCTG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
TTATTAACCTCAAACTGTGAGGTAATCATCACCAAAAGGTAGATATGCCAGCCCAAGAAAGTATATCTGAAACACCTATCTCTCTCTCAACACCA	<i>C. albicans</i> orf19.454
TTATGTGCTCCAGATTTGGAATTTAATTA--ACTGCTGTGTT--GAGGCGC--CTCTCCCAAAAGATGACATCTCTCTCTTTTCTCTCAATTAATTAAC	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
TGATAACATCACTCTCAAAACCTTCTCTCTCTG--AGCTGCAATTTGCGATCTGAAATCTTCTAGTGGTATCTTTGGGGAG--GGGCAITGCTAG--TGTTA	<i>C. albicans</i> orf19.454
CTCT--CATGACGTCGAGCAGCTCTCAAGCTATTCAGAGCGACCTCTCAAAATAGAACTCTGAGCTATCTTTGCCCAACCGGACCTCTAGAAATCTG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
GTGATTTGCAAACTCATAGGACAGGTAGTCTGGTGGTTTGCACCAATCAATCAAGATATGATTAATAAACGCTTAAGGTAATAGTGATGAATGGG	<i>C. albicans</i> orf19.454
CGAG--GTGCAATTTAGAGAGAGAGGAGC--GGTC--TTTATCTTTTATGATCAAA--GAGATAGAGGACCTCAGTCTGATTAAGAGATAA--GG	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W
AGGCTCTAAGAGAGAAATTAAG--TTAA	<i>C. albicans</i> orf19.454
CGCTC--GGACTCAAAAGGTTAGATGGA	<i>S. cerevisiae</i> YOR140W

Abbildung 6. Sequenzvergleich *SFL1* von *S. cerevisiae* und *C. albicans*.

Der *C. albicans* orf19.454 ist homolog dem *S. cerevisiae* *SFL1*, das durch den ORF YOR140 kodiert wird. Die DNA-Sequenzen von *SFL1* weisen eine Identität von 23% auf.





Die Proteinsequenz enthält eine HSF-DNA-Bindedomäne (heat shock factor) von Aminosäure an Position 116 bis 204 im Protein. In der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ist die Proteinsequenz des *CaSfl1* mit der Bezeichnung XP\_715888 eingetragen. Das *SFL1*-Gen konnte ebenso in verwandten Gattungen, wie *Aspergillus fumigatus*, *Ashbya gossypii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *Kluyveromyces lactis*, identifiziert werden (Abbildung 8). Die HSF-DNA-Bindedomäne ist in allen diesen Proteinen konserviert.

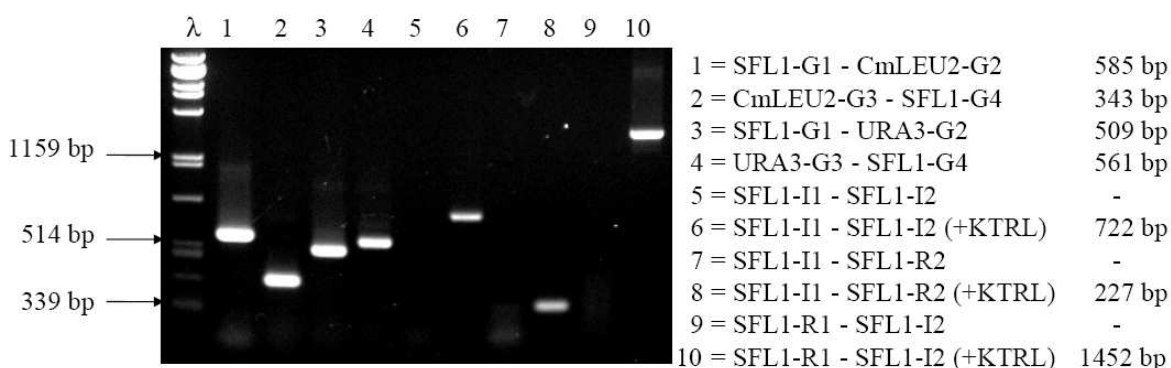
[illegible]

**Abbildung 8. Sequenzanalyse und -vergleich von *CaSFL1*.**

Die Proteinsequenz von CaSfl1 wurde mit homologen Sequenzen von *A. fumigatus*, *A. gossypii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *K. lactis* und *S. cerevisiae* verglichen. In allen Sequenzen ist die HSF-DNA-Bindedomäne vorhanden.

### 3.1.2 Deletion von *SFL1* in *Candida albicans*

Mittels PCR-basierter Gendeletion konnten beide Allele des Gens *SFL1* in *C. albicans* mit entsprechenden Markergenen ersetzt werden. Dabei wurden zunächst die beiden heterozygoten Mutanten CAJ025 *SFL1/sfl1::CmLEU2* und CAJ027 *SFL1/sfl1::CdHIS1* aus dem Stamm SN148 (Noble und Johnson, 2005) erzeugt. Aus diesen heterozygoten Stämmen entstanden die beiden homozygoten Mutanten CAJ029 *sfl1::CmLEU2/sfl1::CdHIS1* und CAJ035 *sfl1::CdHIS1/sfl1::CmLEU2*. Da für das Hyphenwachstum und die Virulenz von *C. albicans* das Vorhandensein der Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase nötig ist, wurde das *URA3*-Markergen durch Markeraustausch in den für *URA3* defekten Stamm eingebracht. Dabei entstand die Deletionsmutante CAJ071 *sfl1::CmLEU2/sfl1::URA3*. Diese Gendisruption und Markerintegration konnte mittels Kolonie-PCR verifiziert werden, indem DNA-Fragmente vom Übergang von ursprünglicher Genomsequenz zum Markergen amplifiziert wurden (siehe 2.4.2). Ebenso wurden genspezifische interne Oligonukleotide generiert, um eine vollständige Deletion des ORF nachzuweisen (Abbildung 9).

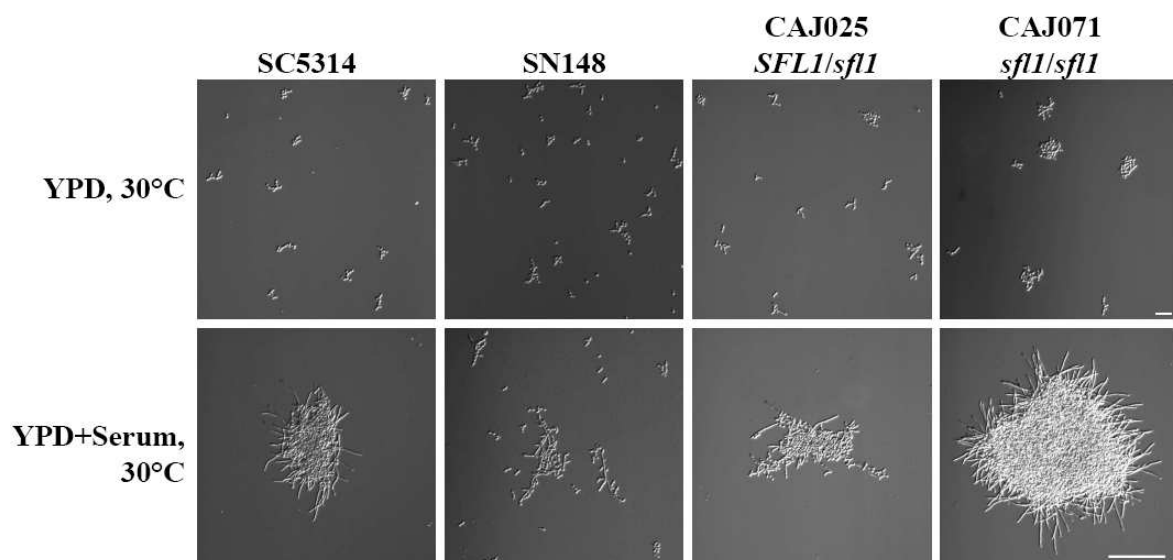


**Abbildung 9. Disruptionsnachweis von *SFL1* mittels PCR.**

Für den Nachweis der korrekten Integration des Markergens im Ziellokus wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Es wurden DNA-Fragmente vom Übergang von stromabwärts (downstream) gelegener Gensequenz zum Markergen (G1-G2), sowie vom Markergen zur stromaufwärts (upstream) gelegenen Gensequenz (G3-G4) amplifiziert. Zur Bestätigung der vollständigen Deletion von *SFL1* wurden Gen-interne Oligonukleotide für die PCR verwendet. Als Positivkontrolle für diese PCR diente genomische DNA des Wildtyp-Stammes SC5314.

### 3.1.3 Zell- und Koloniemorphologie des Deletionsstammes *sf11/sf11*

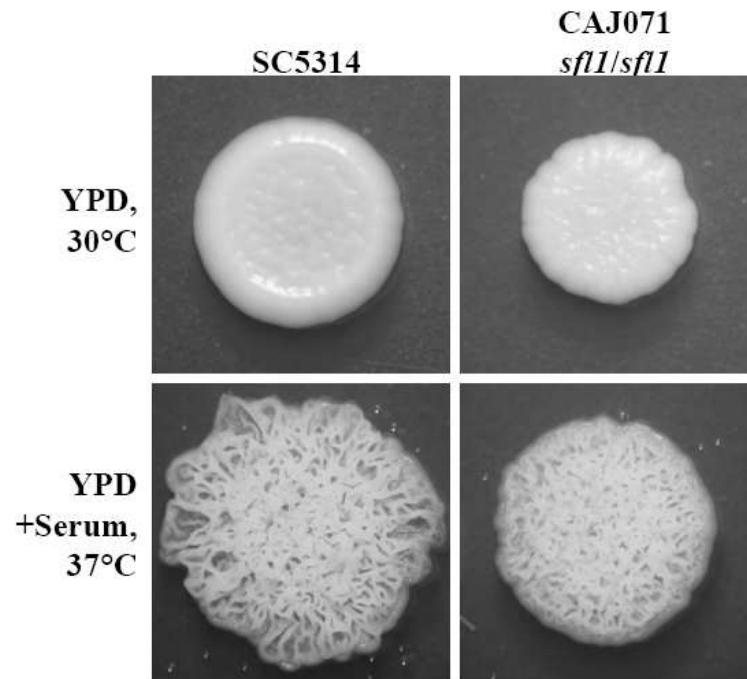
Der *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314, die heterozygote Mutante CAJ025 *SFL1/sf11::CmLEU2* und die Deletionsmutante CAJ071 *sf11::CmLEU2/sf11::URA3* wurden sowohl in Voll- als auch in Minimalmedium inkubiert, um morphologische Auswirkungen der Gendeletion zu beobachten. Werden die Stämme in YPD-Vollmedium angezogen, so ist bezüglich der Zellform und der Wachstumsrate kein Unterschied zum Ausgangsstamm bzw. zum Wildtypstamm SC5314 zu beobachten. Allerdings zeigt sich bei der *sf11*-Deletionsmutante eine erhöhte Aggregatbildung der Zellen (siehe 3.1.5). Eine Induktion des Hyphenwachstums durch Zugabe von 10% Serum und Inkubation bei 37°C resultierte sowohl bei der Deletionsmutante, als auch beim SC5314 Wildtyp-Stamm in der Ausbildung von Hyphenzellen. Bei der *sf11*-Mutante kam es hier ebenfalls zu einer stärkeren Zell-Zellaggregation, so dass sich Zellflocken ausbildeten (Abbildung 10).



**Abbildung 10. Zellmorphologie der *sf11*-Deletionsmutante.**

Die *sf11*-Deletionsmutante CAJ071 zeigt im Vergleich zum Wildtyp SC5314 und den Ausgangsstämmen, SN148 und CAJ025, eine erhöhte Zellaggregatbildung, sowohl im Hefezellstadium bei einer Temperatur von 30°C, als auch im Hyphenzellstadium bei einer Temperatur von 37°C und in Anwesenheit von 10% Serum. Größenbalken 30µm (oben) und 100µm (unten).

Die Koloniemorphologie des *sf11*-Deletionsstammes auf Vollmedium unterscheidet sich geringfügig von der des Wildtyp-Stammes SC5314. Eine Kolonie des Stammes CAJ071 ist runzlicher und der Rand ist leicht eingekerbt. Die Kolonieform unter hypheninduzierenden Bedingungen, in Anwesenheit von 10% Serum und Inkubation bei 37°C, entspricht der des Wildtyp-Stammes mit der runzligen Oberfläche (Abbildung 11).



**Abbildung 11. Koloniemorphologie *sfl1*-Deletionsstamm.**

Die *sfl1*-Deletionsmutante zeigt auf YPD-Medium bei 30°C eine runzeligere und am Rand eingekerbte Kolonie im Vergleich zu der glattrandigen Kolonie mit gleichmäßiger Oberfläche des Wildtyp-Stammes. Eine Inkubation der Stämme bei 37°C und in Anwesenheit von 10% Serum führt zu einer runzeligen Oberfläche.

### 3.1.4 Quantifizierung der Zellaggregate

Die Zellaggregatbildung der *sfl1*-Deletionsmutante konnte durch Auszählen von Zellverbänden im Verhältnis zur Gesamtzellzahl quantifiziert werden. Hierbei wurde festgestellt, dass sowohl der Wildtyp-Stamm SC5314 als auch beide Vorläuferstämme der *sfl1*-Deletionsmutante, SN148 und CAJ025, zu ~70% in Verbänden von 1-4 Zellen vorliegen. Zellaggregate von 5 bis 10 Zellen findet man bei diesen Stämmen mit einer Wahrscheinlichkeit von 23% bis 31% und Zellen in Aggregaten mit mehr als 10 Zellen kommen bis zu 6% vor. Bei der *sfl1*-Deletionsmutante CAJ071 sind allerdings nur 20% in Zellverbänden bis zu 4 Zellen organisiert, Zellaggregate von 5 bis 10 Zellen kommen mit einer Häufigkeit von 15% vor und 65% der Zellen des Deletionsstammes findet man in Zellaggregaten mit mehr als 10 Zellen wieder (Tabelle 4).

Tabelle 4. Zellaggregatbildung bei *sfl1*-Deletionsmutante.

	SC5314		SN148		CAJ071 <i>sfl1/sfl1</i>	
Zellaggregate	Zellzahl	Anteil %	Zellzahl	Anteil %	Zellzahl	Anteil %
1-2 Zellen	166	39 %	155	30 %	60	9 %
3-4 Zellen	134	32 %	204	39 %	76	11 %
5-10 Zellen	96	23 %	162	31 %	98	15 %
> 10 Zellen	24	6 %	0	0 %	428	65 %
gesamt	420	100 %	521	100 %	662	100 %

Die Quantifizierung der Zellverbände ergibt eine stärkere Ausbildung von Zellaggregaten bei der *sfl1*-Deletionsmutante mit einer Häufigkeit von 65% Zellen in Zellverbänden mit mehr als 10 Zellen im Vergleich zu den Vorläuferstämmen mit einem Anteil von nur 6% Zellen.

Ebenso konnte die Zellaggregatbildung durch Messung der optischen Dichte in einer Zellkultur bestimmt werden, da aggregierte Zellen schneller in einer Kultur absinken als einzelne Zellen. Hierbei wurde beobachtet, dass die Trübung einer *sfl1*-Deletionsmutantenkultur bereits nach 1min um 25% abnimmt, während eine Wildtypstammkultur eine gleich bleibende Trübung aufweist (Abbildung 12).

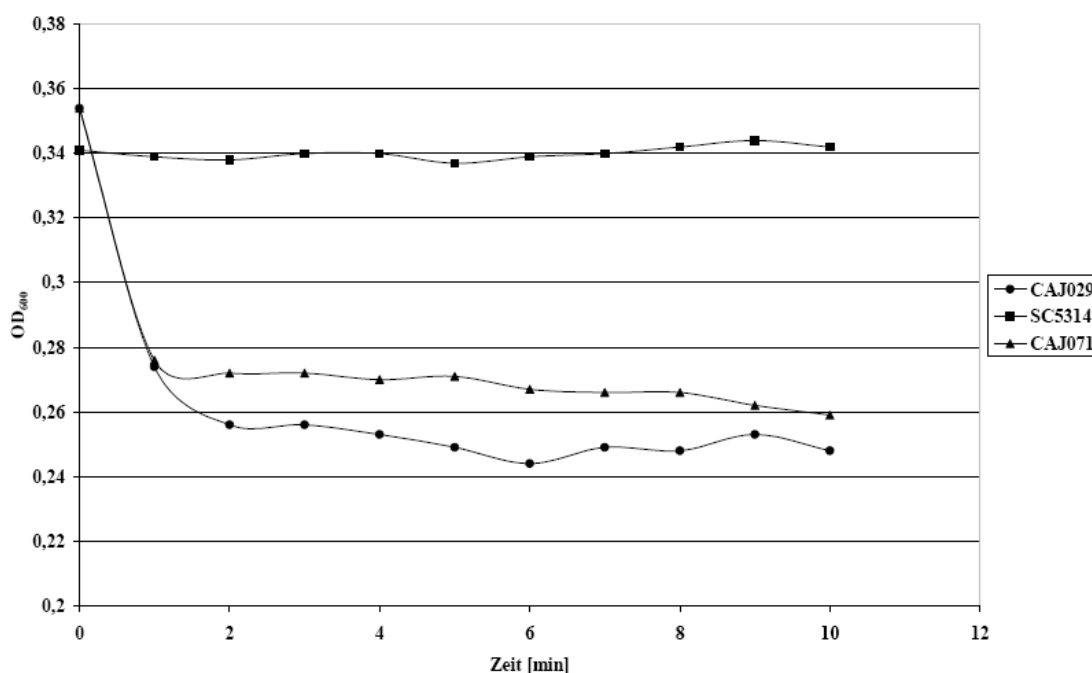
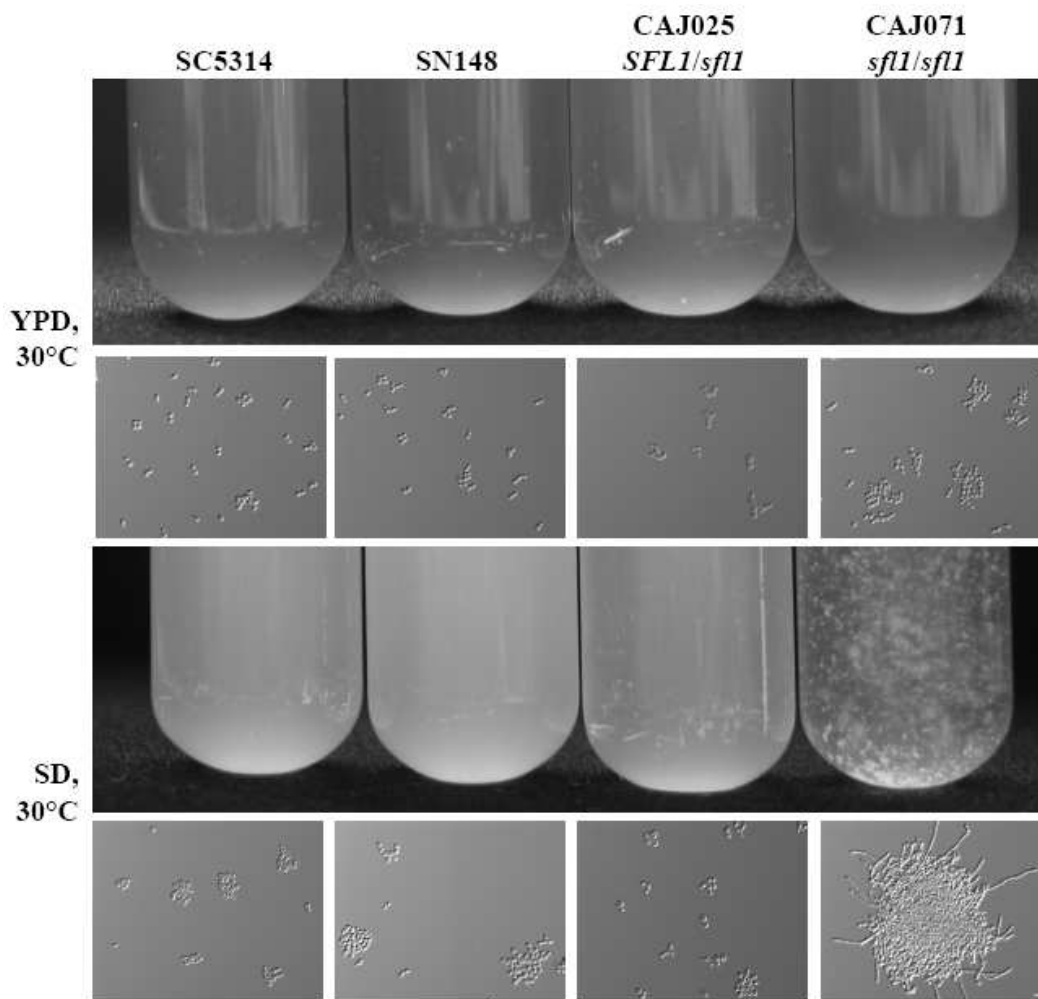


Abbildung 12. Quantifizierung der Zellaggregatbildung mittels optischer Dichte.

Kulturen vom Wildtyp-Stamm SC5314 und der *sfl1*-Deletionsmutanten CAJ029 *sfl1::CmLEU2/sfl1::CdHIS1* und CAJ071 *sfl1::CmLEU2/sfl1::URA3* wurden auf gleiche optische Dichte eingestellt und dessen Verlauf über die Zeit verfolgt. Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm sinkt die optische Dichte der Deletionsmutanten. Durch die Zellaggregatbildung der Deletionsmutanten sinken die Zellen nach 1min ab.

### 3.1.5 Zellaggregatbildung unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

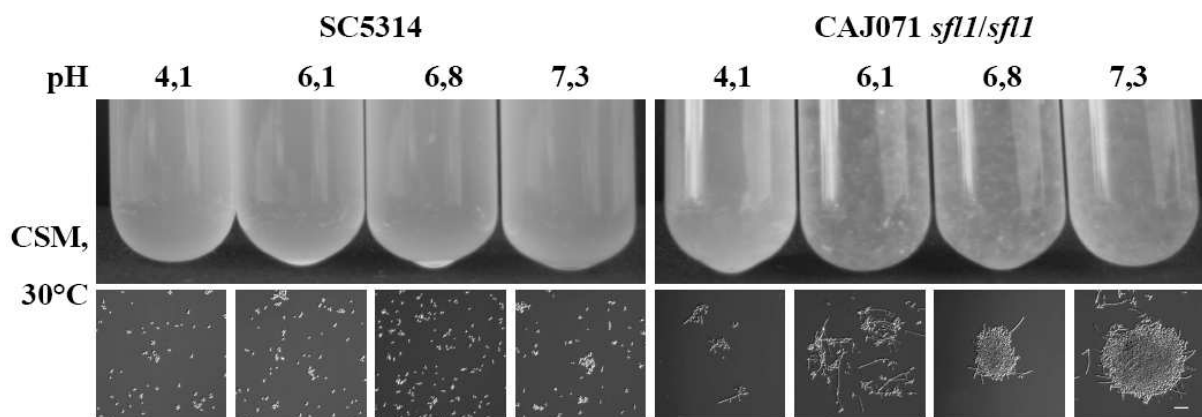
Eine Inkubation in Vollmedium führt bei der *sfl1*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm SC5314 und den Vorläuferstämmen SN148 und CAJ025 *SFL1/sfl1* zu einer Zellaggregation. Der Effekt der Zell-Zelladhäsion der *sfl1*-Deletionsmutante wird durch die Inkubation in Minimalmedien wie CSM oder SD verstärkt. Hier konnte im Vergleich zur Inkubation in Vollmedium sowohl eine verstärkte Verklumpung der Zellen als auch die Ausbildung von Hyphenzellen bei 30°C beobachtet werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13. Zellaggregatbildung der *sfl1*-Deletionsmutante**

Die *sfl1*-Deletionsmutante zeigt in YPD-Medium im Vergleich zum Wildtyp-Stamm und den Vorläuferstämmen einen Zellaggregationsphänotyp. In SD-Minimalmedium ist dieser Effekt verstärkt. Zudem kann in Minimalmedium bei 30°C die Ausbildung von Hyphenzellen beobachtet werden. Größenbalken 10µm.

Des Weiteren wurde der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstumsverhalten der *sfl1*-Deletionsmutante überprüft. Hierzu wurde CSM-Minimalmedium pH 4,1 mit Kaliumphosphatpuffer auf pH-Werte von 6,1; 6,8 und 7,3 eingestellt. Während der Wildtyp-Stamm SC5314 keine Veränderung in der Zellaggregation mit steigendem pH-Wert zeigt, ist bei der *sfl1*-Deletionsmutante CAJ071 ein deutlich stärkeres Agglutinierungsverhalten zu beobachten. Die Zellen der Mutante bilden mit steigendem pH-Wert größere Flocken aus (Abbildung 14).

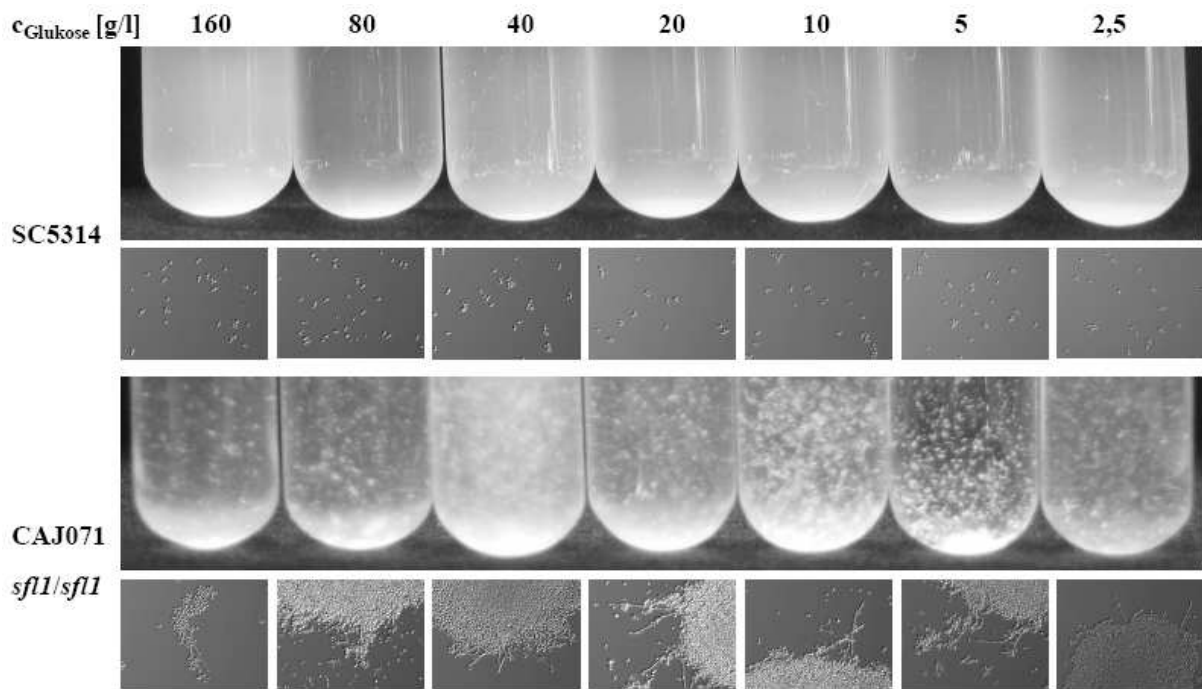


**Abbildung 14. Einfluss von pH-Wert auf Zellaggregation.**

Der *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314 und die *sfl1*-Deletionsmutante wurden in CSM-Minimalmedium mit verschiedenen pH-Werten inkubiert. Dabei führte eine Verschiebung des pH-Wertes vom sauren in den neutralen bis basischen Bereich zu einer stärkeren Zellaggregation bei der *sfl1*-Deletionsmutante. Die Zellverteilung beim Wildtyp-Stamm SC5314 bleibt dagegen nahezu unverändert. Größenbalken 10µm.

Um einen Einfluss der Glukosekonzentration auf die Aggregation der Zellen zu untersuchen, wurden CSM-Medien mit Glukosekonzentrationen von 2,5 bis 160g/l mit dem Wildtyp-Stamm SC5314 und der *sfl1*-Deletionsmutante CAJ071 inkubiert. Der Stamm SC5314 zeigt keine Veränderung bezüglich der Zell-Zell-Adhäsion während des Wachstums in glukoseminimiertem bzw. -erhöhtem Medium. Alle Zellen des Stammes liegen in der Kultur als Einzelzellen oder in Zellaggregaten aus wenigen Zellen vor. Die *sfl1*-Deletionsmutante zeigt in allen getesteten Glukosekonzentrationen die Ausbildung von Zellaggregaten und Hyphenzellen. Allerdings ist bei einer Konzentration von 160g Glukose je Liter Medium eine Auflösung der größeren Zellaggregate in kleinere Zellverbände zu beobachten (Abbildung 15).

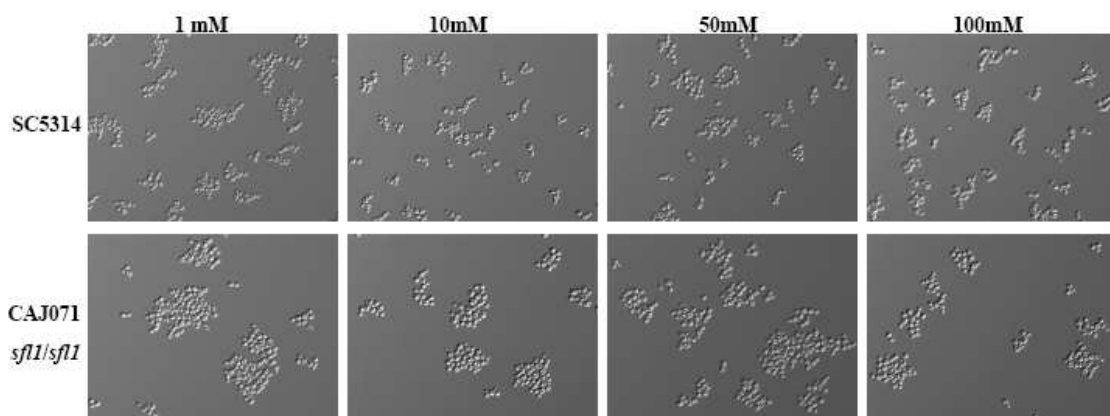




**Abbildung 15. Einfluss der Glukosekonzentration auf die Flockulierung.**

Der Wildtyp-Stamm SC5314 und die *sfl1*-Deletionsmutante CAJ071 wurden in CSM-Medium mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen inkubiert. Der Stamm SC5314 zeigt keine Veränderung der Zellaggregation in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration. Die *sfl1*-Deletionsmutante CAJ071 zeigt in allen Glukosekonzentrationen die Ausbildung von Hyphen und Zellflocken.

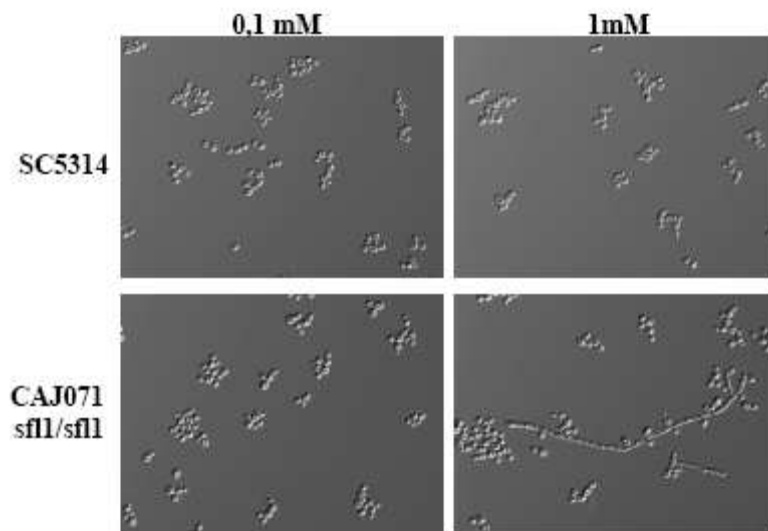
Ebenso wurde der Einfluss von Mannose auf das Wachstumsverhalten der *sfl1*-Deletionsmutante getestet. Hierbei wurden dem Medium Konzentrationen von 1mM bis 100mM Mannose zugesetzt. Der Wildtyp-Stamm SC5314 zeigt hinsichtlich der Zellverteilung keine Veränderung in Abhängigkeit von der Mannosekonzentration. Die *sfl1*-Deletionsmutante zeigt in allen getesteten Mannosekonzentrationen eine gleich bleibende Agglutininierung von Zellen (Abbildung 16).



**Abbildung 16. Einfluss von Mannose auf das Wachstumsverhalten.**

Der Wildtyp-Stamm SC5314 zeigt in Minimalmedium mit 1 bis 100mM Mannose keine Veränderung der Zellverteilung. Die *sfl1*-Deletionsmutante zeigt in allen Konzentrationen eine gleich bleibende Zellaggregation.

Des Weiteren wurde EGTA als Chelatbildner dem Medium zugesetzt, um einen Einfluss von Mangel an zweiwertigen Ionen, insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$ , zu testen. Dem Minimalmedium wurden 0,1 und 1mM EGTA zugesetzt. Der Wildtyp-Stamm SC5314 zeigt keine Veränderung bezüglich der Zellaggregation oder –morphologie. Die *sfl1*-Deletionsmutante zeigt bezüglich der Zellaggregation keine Veränderung, allerdings sind vereinzelte Hyphenzellen in der Kultur vorhanden (Abbildung 17).



**Abbildung 17. EGTA-Einfluss auf Wachstumsmorphologie.**

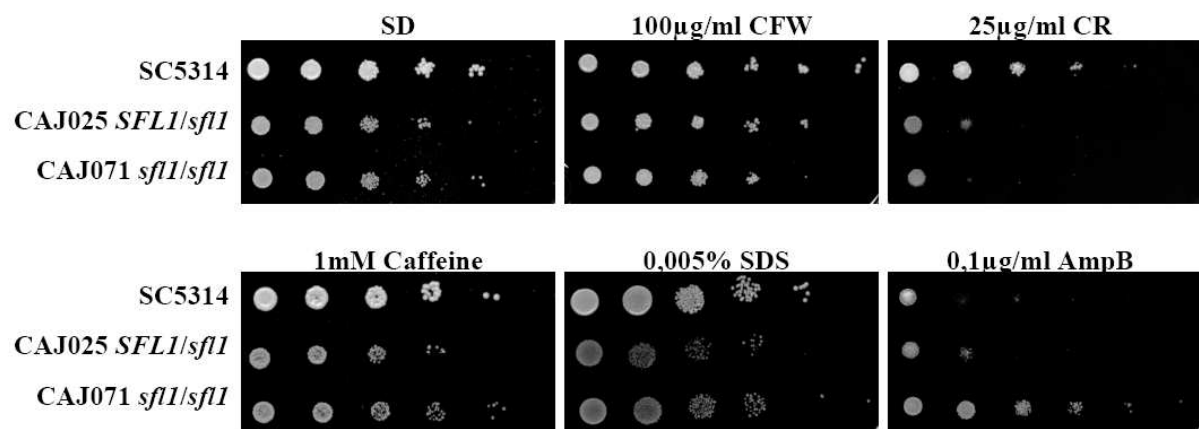
Eine Konzentration von 0,1 und 1mM EGTA in Minimalmedium hat keinen Einfluss auf die Wachstumsmorphologie des Wildtyp-Stammes SC5314, während der *sfl1*-Deletionsstamm bei einer Konzentration von 1mM EGTA vereinzelt Hyphenzellen ausbildet.

### 3.1.6 Einfluss zellwand- und membranzerstörender Substanzen

Aufgrund des veränderten Zell-Adhäsionsverhaltens der *sfl1*-Deletionsmutante wurde der Stamm auf Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber verschiedenen zellwand- und membranzerstörenden Substanzen getestet. Diese wurden SD-Festmedium zugesetzt und eine Verdünnungsreihe des Wildtyp-Stammes SC5314 und der Mutante CAJ071 *sfl1/sfl1* aufgebracht. Die getesteten Substanzen Calcofluor White (Sigma) und Congo Red inhibieren Chitin- und  $\beta(1,3)$ -Glucansynthasen (Roncero und Durán, 1985). 1,3,7-Trimethylxanthin (Coffein, Caffeine, Sigma) ist ein natürliches Purin-Analoga und bewirkt eine Phosphorylierung von Slt2, der mitogen-aktivierten Proteinkinase des Pkc1-Signaltransduktionsweges, die die Aufrechterhaltung der Zellwandstabilität reguliert. Sensitivität gegenüber Coffein ist ein charakteristisches Merkmal von Mutanten mit Defekten im Pkc1-Signaltransduktionsweg (Costigan *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Jacoby *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2005). Weitere Studien zeigten, dass

*TOR1* das Zielgen von Coffein ist, dessen Inhibierung den Slt2-Pkc1-Kaskade aktiviert (Kuranda *et al.*, 2006). Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt eine Solubilisierung von Membran- und Glykoproteinen. Amphotericin B (Sigma) ist ein Antimykotikum, das das Ergosterin der Pilzzellwand bindet, was zu einer erhöhten Permeabilität der Membran für  $K^+$ -Ionen führt.

Die Substanzen mit den Konzentrationen im Medium von 100µg/ml Calcofluor White, 1mM Coffein und 0,005% SDS haben keinen Einfluss auf das Wachstum der *sfll*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm SC5314, der Deletionsstamm wächst in allen Verdünnungsstufen ähnlich dem Vergleichsstamm. Ein verringertes Wachstum ist bei 25µg/ml Congo Red sowohl bei der heterozygoten als auch der homozygoten Mutante zu beobachten. Ein direkter Einfluss der Substanz, der auf die *sfll*-Deletion zurückzuführen ist, kann somit ausgeschlossen werden. Allerdings zeigt eine Konzentration von 0,1µg/ml Amphotericin B im Medium eine gesteigerte Wachstumsfähigkeit der *sfll*-Deletionsmutante gegenüber dem Vergleichsstamm und der Mutante CAJ025 *SFL1/sfll*. Eine Deletion von *sfll* führt demnach zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Antimykotikum (Abbildung 18).

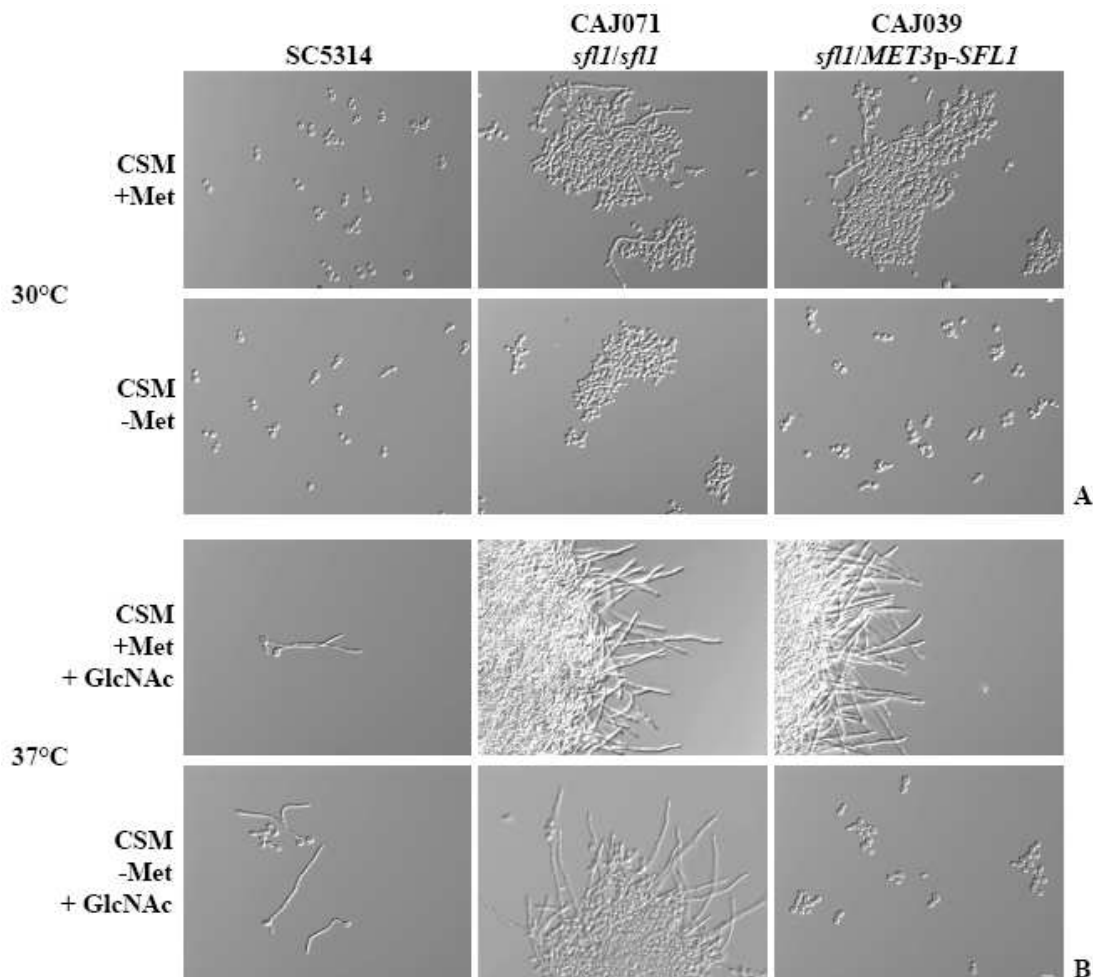


**Abbildung 18. Wirkung zellwand- und membranzerstörender Substanzen**

Es wurde jeweils eine 1:10 Verdünnungsreihe einer Kultur mit optischer Dichte  $OD_{600}=0,3$  des Wildtyp-Stammes SC5314, der heterozygoten Mutante CAJ025 *SFL1/sfll* und der *sfll*-Deletionsmutante CAJ071 *sfll/sfll* auf Medien mit 100µg/ml Calcofluor White (CFW), 25µg/ml Congo Red (CR), 1mM Coffein, 0,005% Natriumdodecylsulfat (SDS) und 0,1µg/ml Amphotericin B (AmpB) aufgetragen.

### 3.1.7 Methioninpromotor-kontrollierte Genexpression von *SFL1*

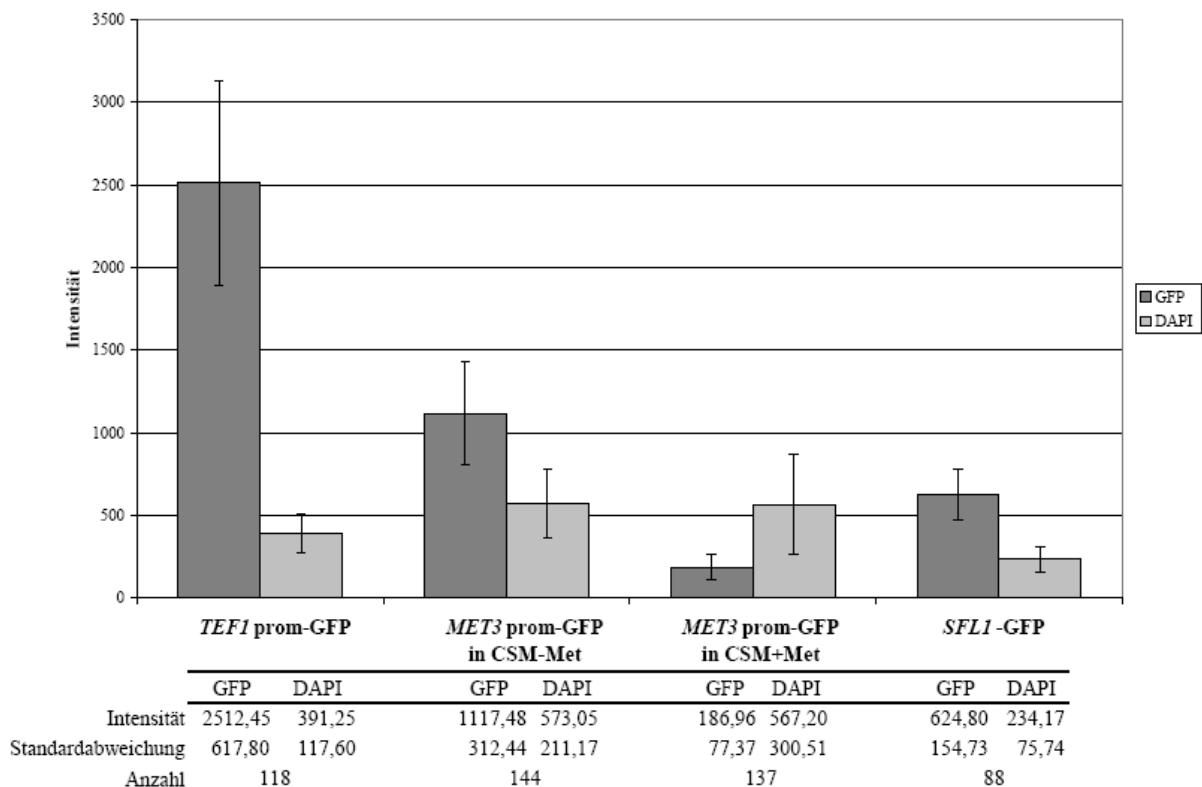
Zur regulierbaren Expression von *SFL1* in *C. albicans* wurde der offene Leserahmen mittels PCR-basierter Promotorfusion mit dem *MET3*-Promotor aus *C. albicans* in der heterozygoten Mutante CAJ025 *SFL1/sfl1::CmLEU2* fusioniert. Es entstand der Stamm CAJ039 *sfl1::CmLEU2/HIS1-MET3prom-SFL1*. Eine Repression der Genexpression von *SFL1* durch Zugabe von 3,5mM Methionin resultierte in der Ausbildung des mutanten Phänotyps entsprechend der *sfl1*-Deletionsmutante. Es konnten Zell-Zellaggregate mit vereinzelt Hyphen unter nicht hypheninduzierenden Bedingungen in Minimalmedium beobachtet werden (Abbildung 19A). Eine Überexpression des mit dem *MET3*-Promotor fusionierten *SFL1*-ORF durch Vorinkubation in Methioninmangelmedium resultierte in einer Reprimierung der Hyphenbildung unter hypheninduzierenden Bedingungen bei 37°C und 0,5g/l N-Acetylglucosamin (GlcNAc) (Abbildung 19B).



**Abbildung 19. *MET3*-Promotor reguliertes *SFL1*.**

Die Repression der *SFL1*-Genexpression beim Stamm CAJ039 *sfl1/MET3p-SFL1* wurde durch die Zugabe von 3,5mM Methionin (Met) zum CSM-Medium bei 30°C Inkubationstemperatur erreicht. Dies resultierte in einer Aggregation der Zellen, einem Phänotyp, der der *sfl1*-Deletionsmutante entspricht (A). Eine Überexpression von *SFL1* durch Inkubation des Stammes CAJ039 in Methionin-Mangelmedium führte unter hypheninduzierenden Bedingungen, wie einer Temperatur von 37°C und Anwesenheit von 0,5g/l N-Acetylglucosamin (GlcNAc), zu einer Repression der Hyphenbildung (B). Größenbalken 10µm.

Um die Überexpression des *CaMET3*-Promotor getriebenen ORF zu belegen, wurde ein *MET3*prom-GFP-Signal sowohl unter reprimierenden als auch unter exprimierenden Bedingungen quantifiziert. Als Vergleichsstämme dienten ein Stamm mit *AgTEF1*-Promotor-GFP-Fusion und eine *SFL1*-GFP-Fusion. Eine Überexpression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (GFP) durch den *AgTEF1*-Promotor führte zu einem Fluoreszenzsignal mit einer Intensität von ca. 2500 Einheiten. Eine durch den *MET3*-Promotor regulierte GFP-Expression führte zu einer Intensität von ca. 1100 Einheiten. Wird diese Genexpression durch die Zugabe von Methionin zum Medium reprimiert, so sinkt die Signalstärke auf ca. 190 Einheiten. Eine Expression von *SFL1*-fusioniertem GFP über den nativen *SFL1*-Promotor zeigt eine Intensität von ca. 620 Einheiten. Eine *MET3*-Promotor getriebene Expression ergibt also eine höhere GFP-Intensität als die des *SFL1*-Promotors, so dass die Expressionsrate durch den *MET3*-Promotor höher ist als die des *SFL1*-Promotors. Als Basiswert wurde die Fluoreszenzintensität eines DAPI-Signals von ca. 250 bis 500 Einheiten bestimmt (Abbildung 20).

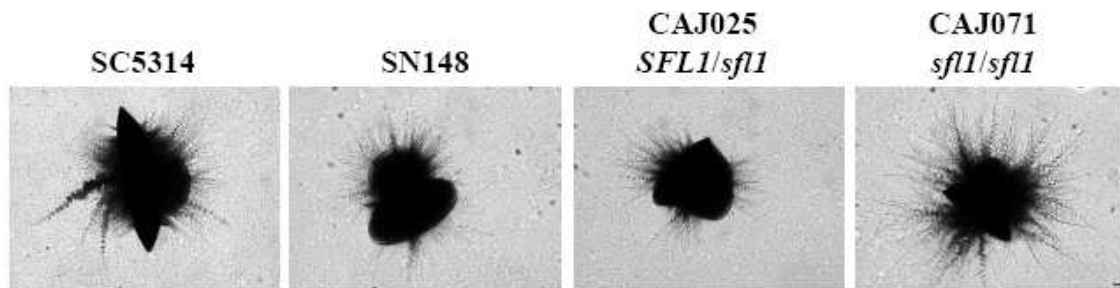


**Abbildung 20. Quantifizierung der GFP-Signale mit unterschiedlichen Promotoren.**

Eine *AgTEF1*-Promotor-regulierte GFP-Expression resultiert in einer Fluoreszenzintensität von ca. 2500 Einheiten. Eine *MET3*-Promotor regulierte GFP-Expression liefert eine Fluoreszenzintensität von ca. 1100 Einheiten. Eine Reprimierung des *MET3*-Promotors durch Zugabe von Methionin führt zu einer GFP-Intensität von ca. 190 Einheiten. Eine GFP-Expression unter nativem *SFL1*-Promotor führt zu einer Fluoreszenzintensität von ca. 620 Einheiten.

### 3.1.8 Wachstumsmorphologie unter mikroaerophilen Bedingungen

Die Stämme SC5314, SN148, CAJ025 *SFL1/sfl1* und CAJ071 *sfl1/sfl1* wurden in YPS-Agar bei einer Temperatur von 25°C für 5 Tage angezogen und mikroskopiert. Durch die Inkubation in sorbosehaltigem Medium unter mikroaerophilen Bedingungen kommt es zur Ausbildung von Hyphenzellen, wobei der Transkriptionsfaktor *CZF1* in die Regulation des Hyphenwachstums involviert ist (Brown *et al.*, 1999). Der Wildtyp-Stamm SC5314, als auch die beiden Vorläuferstämme SN148 und CAJ025 *SFL1/sfl1* zeigen Hyphenbildung. Bei dem Stamm CAJ071 *sfl1/sfl1* ist dieser Effekt verstärkt. Es sind deutlich mehr Hyphenzellen aus einzelnen Kolonien ausgebildet worden (Abbildung 21).

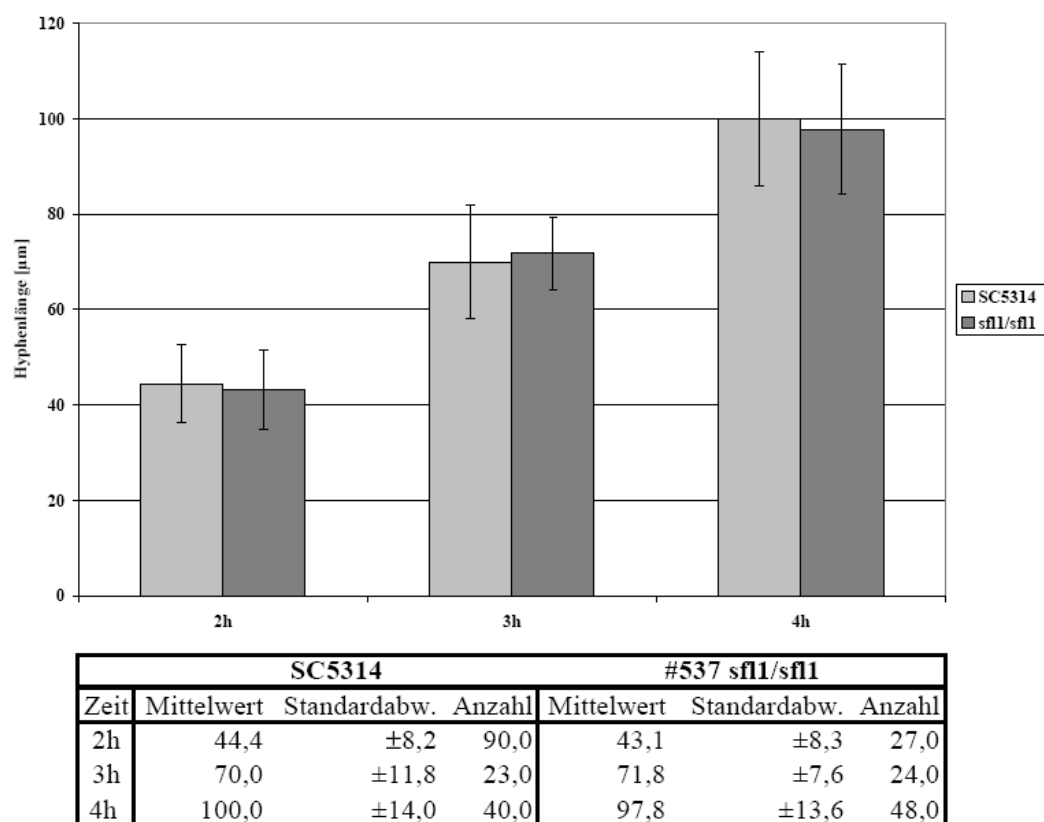


**Abbildung 21. Morphologie unter mikroaerophilen Bedingungen**

In YPS-Agar eingebettete Kolonien zeigen nach 5 Tagen Inkubation die Ausbildung von Hyphen. Die *sfl1*-Deletionsmutante zeigt eine ausgeprägtere Hyphenbildung verglichen mit dem Wildtyp und den Vorläuferstämmen unter diesen Bedingungen. Größenskala 50µm.

### 3.1.9 Quantifizierung des Hyphenwachstums der *sf11*-Deletionsmutante

Da der *sf11*-Deletionsstamm gegenüber dem Wildtyp SC5314 unter m Bedingungen eine stärkere Filamentierung aufweist, wurde das Hyphenwachstum anhand der Hyphenlänge quantifiziert. Hierzu wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase für 4h unter hypheninduzierenden Bedingungen in YPD-Vollmedium bei 37°C und Zugabe von 10% Serum inkubiert. Die Längen der Hyphenzellen wurden durch Vermessung mit der Software Metamorph nach 2, 3 und 4 Stunden bestimmt. Der Wildtyp-Stamm SC5314 konnte nach 2h Hyphenzellen mit einer Länge von 44,4µm, der *sf11*-Deletionsstamm 43,1µm lange Hyphenzellen ausbilden. Nach 3h waren beim Stamm SC5314 70µm lange Hyphenzellen, bei der Mutante 71,8µm lange Zellen zu beobachten. Eine Inkubation von 4h unter hypheninduzierenden Bedingungen führte zu 100µm langen Hyphen beim Wildtyp-Stamm und 97,8µm Zellen bei dem *sf11*-Deletionsstamm. Diese Werte der Zelllängen unterschieden sich nur geringfügig und diese Unterschiede liegen innerhalb der erhaltenen Standardabweichung, so dass das Hyphenwachstum der *sf11*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm nicht abweicht (Abbildung 22).

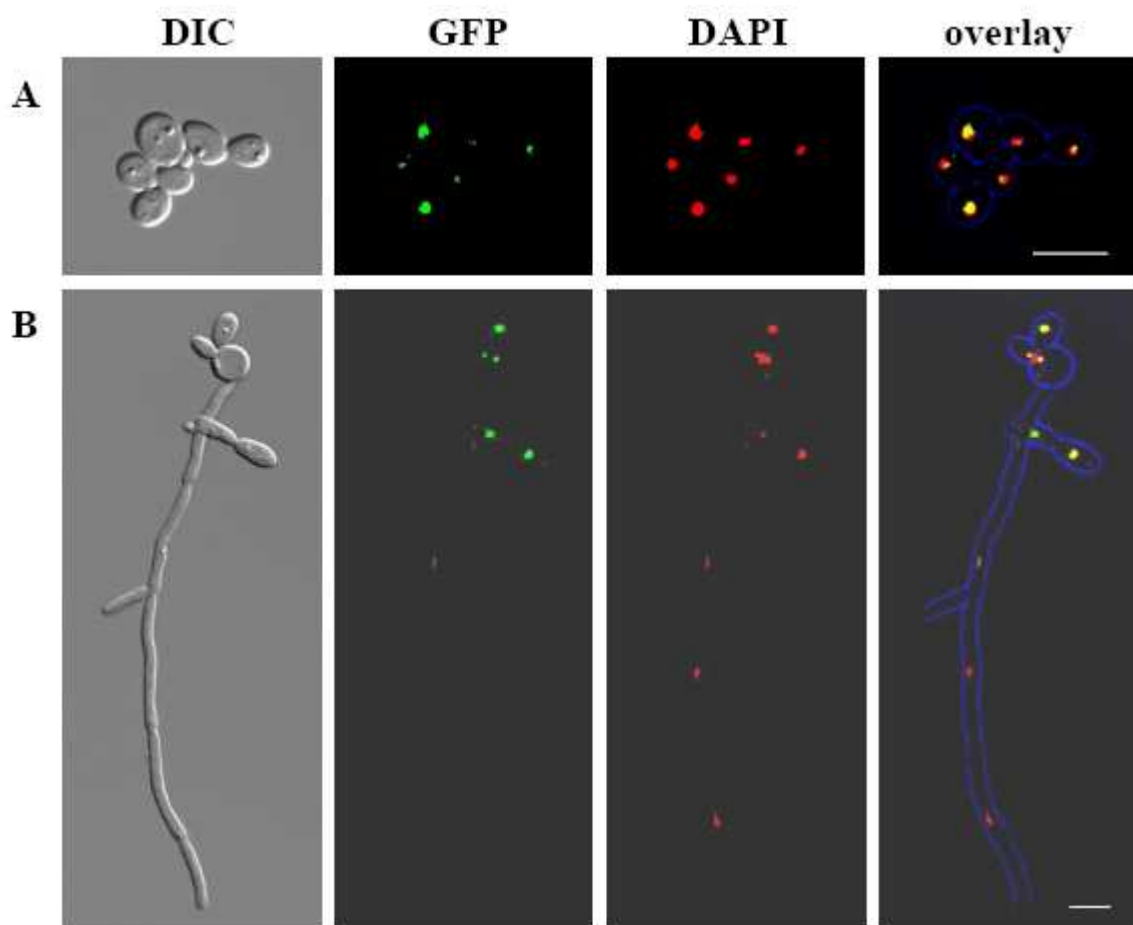


**Abbildung 22. Hyphenwachstum der *sf11*-Deletionsmutante.**

Die Hyphenzelllänge wurde nach 2, 3 und 4h nach Induktion der Hyphenbildung gemessen. Der Wildtyp-Stamm SC5314 zeigt nach 2h Hyphenzellen mit einer Länge von 44,4µm, nach 3h von 70µm und nach 4h von 100µm. Die *sf11*-Deletionsmutante hat nach 2h Hyphenzellen mit einer Länge von 43,1µm, nach 3h von 71,8µm und nach 4h von 97,8µm ausgebildet.

### 3.1.10 Subzelluläre Lokalisierung von Sfl1 mittels einer *SFL1*-GFP-Fusion

Für die Lokalisierung des Proteins Sfl1 *in vivo* wurde der ORF mittels PCR-vermittelter Genfusion mit der Sequenz für das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) am 3'Ende rekombiniert, so dass eine C-terminale Fusion entstand. Die Fluoreszenzmikroskopie-aufnahmen erfolgten mit dem Axio Imager M1 mit einem Filter für Wellenlängen bei 489nm. Es konnte eine definierte Lokalisierung des Sfl1-GFP-Signals beobachtet werden. Eine Co-Färbung der Nuklei mit DAPI zeigte eine Überlagerung der Zellkerne mit dem GFP-Signal, so dass eine Lokalisierung von Sfl1 im Nukleus angenommen werden kann (Abbildung 23).

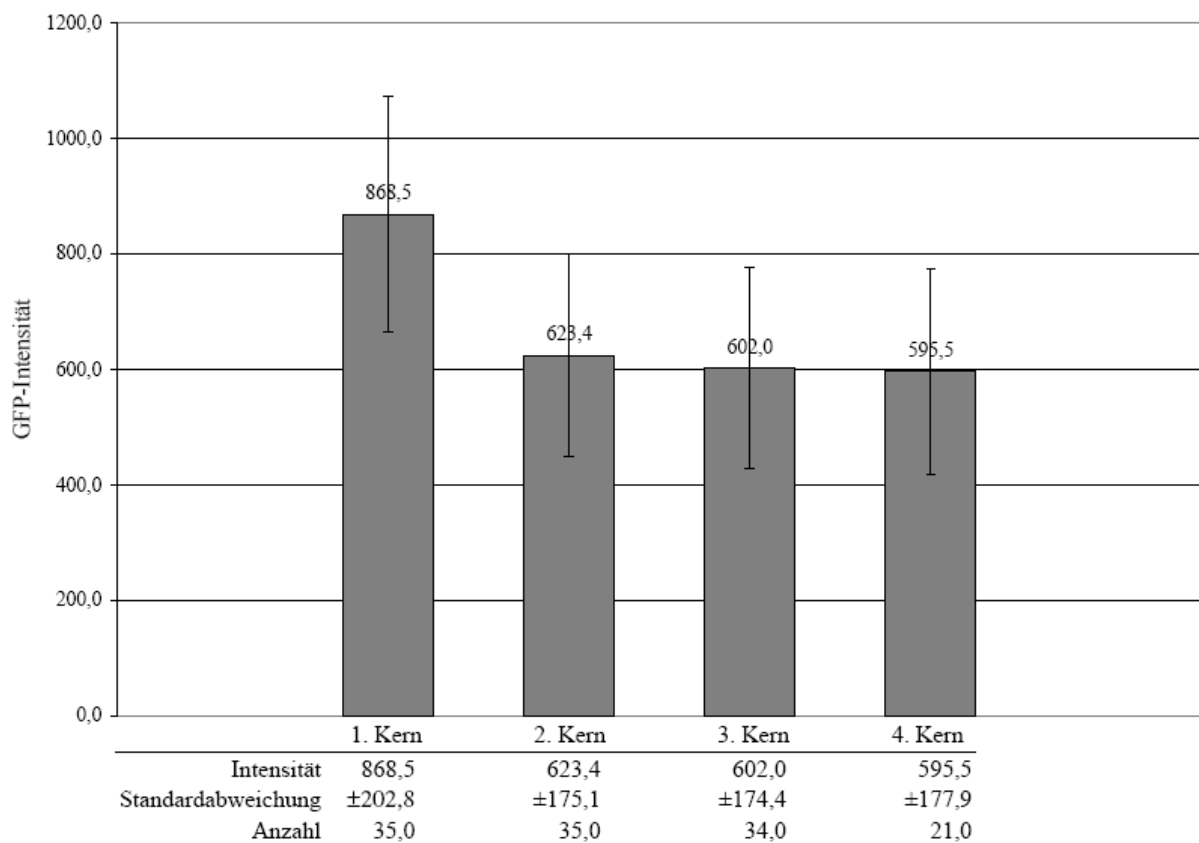


**Abbildung 23. Sfl1-GFP Lokalisierung.**

Durch Fusion des *SFL1*-ORF mit dem GFP wurde eine Lokalisierung des Sfl1 im Nukleus nachgewiesen. Eine Kernfärbung wurde mit DAPI durchgeführt. Eine Überlagerung der beiden Signale zeigt deutlich, dass das GFP-Signal im Kern lokalisiert. Diese Lokalisierung findet man sowohl in Hefezellen (A), als auch in Hyphenzellen (B). Größenbalken 10µm.



Das GFP-Signal in den Hyphenzellen wurde mit der Software Metamorph quantifiziert. Dabei wurde festgestellt, dass sich das GFP-Signal innerhalb einer Hyphenzelle in der Intensität unterscheidet. Die GFP-Intensität im ersten Nukleus der Hyphenzelle entspricht 868,5 Einheiten, während die Intensität der folgenden Nuklei mit 623,4 Einheiten für den zweiten Zellkern, 602 Einheiten für den dritten Nukleus und 595,5 Einheiten für den vierten Nukleus quantifiziert worden ist. Die GFP-Intensität nimmt innerhalb einer Hyphenzelle zur Hyphenspitze hin ab (Abbildung 24).

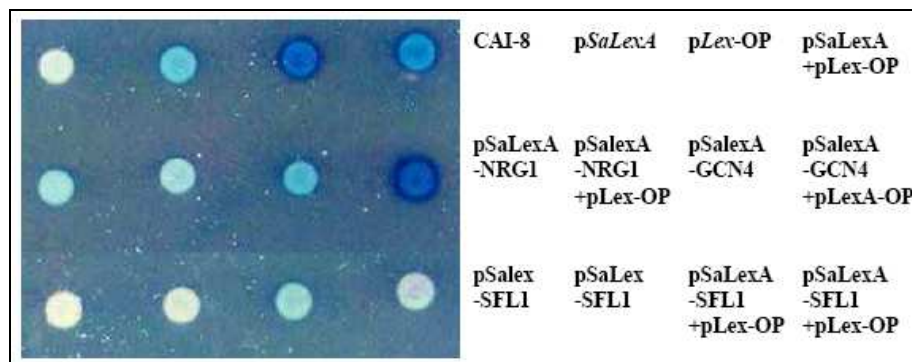


**Abbildung 24. Sif1-GFP-Signal in Hyphenzellen.**

Die Sif1-GFP-Intensität im ersten Nukleus der Hyphenzelle entspricht ca. 870 Einheiten, während Signale von folgenden Nuklei eine Intensität von ca. 620 und 600 Einheiten aufweisen. Das GFP-Signal wird vom 1. Nukleus zur Hyphenspitze hin schwächer, so dass auf eine verminderte Sif1-GFP-Expressionsrate geschlossen werden kann.

### 3.1.11 Ein-Hybrid-Assay

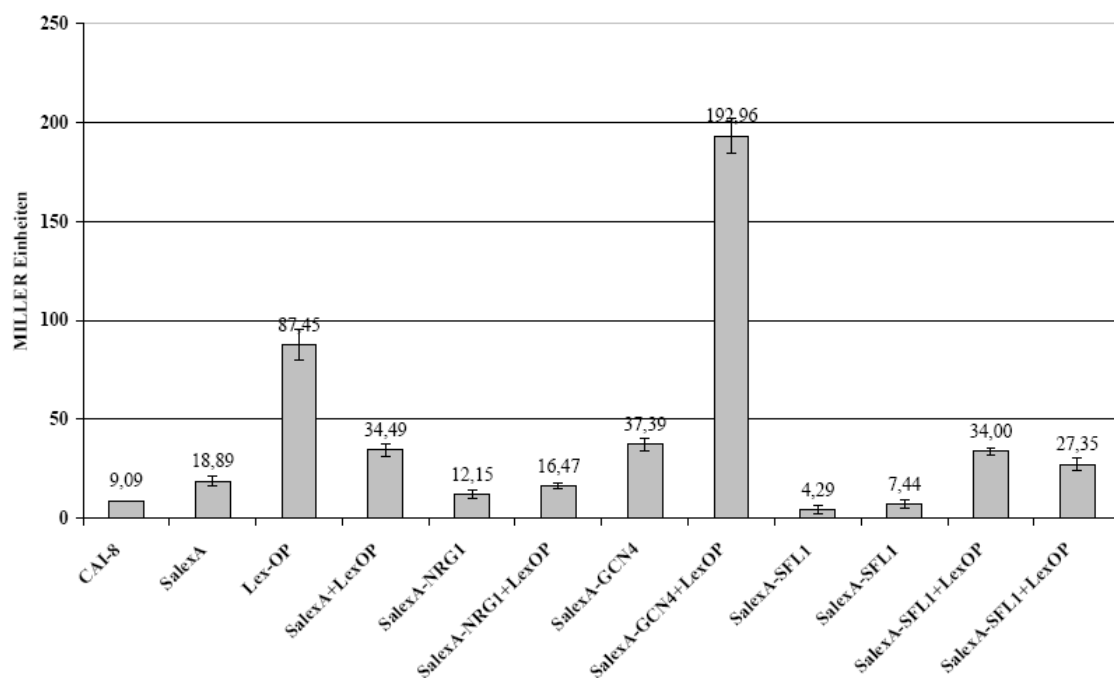
Zur Überprüfung der Funktion von Sfl1 als Transkriptionsfaktor, wurde ein Ein-Hybrid-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die beiden Plasmide mit dem *Staphylococcus aureus* *lexA* und dem *lexA*-Promotor, fusioniert mit dem *lacZ*-ORF aus *Streptococcus thermophilus*, in den auxotrophen Stamm CAI-8 integriert. Dieser Promotorbereich wurde zusätzlich mit einer Operatorsequenz ausgestattet (siehe 2.6). Der Stamm mit integriertem Plasmid p*SalexA* zeigt eine basale Expression von  $\beta$ -Galaktosidase, was anhand des blauen Farbumschlags der Kolonie sichtbar wird. Der Kontrollstamm mit dem Operator-tragenden Plasmid weist eine hohe  $\beta$ -Galactosidase-Expressionsrate auf, die durch Einbringen des Regulators *SalexA* in diesen Stamm auf eine basale Expressionsrate reduziert wird. Ein Stamm mit *SalexA*-fusioniertem-Nrg1 als Transkriptionsrepressor zeigt eine, mit dieser basalen Expressionsrate vergleichenen, verringerte *lacZ*-Expression. Hier führt der Repressor zur Blockade der effizienten Bindung der Transkriptionsfaktoren am Promotor. Eine Fusion des Regulators *SalexA* mit dem Transkriptionsaktivator Gcn4 führt zu einer erhöhten Expressionsrate, was durch eine intensive Blaufärbung der Kolonie erkennbar ist. Hier dient Gcn4 als Aktivator der Transkription. Eine Fusion von Sfl1 mit *SalexA* führt zu einer, im Vergleich zur basalen Expression, verringerten Expressionsrate. Die Kolonien der beiden p*SalexA*-SFL1-Stämme weisen nach Überschichtung mit X-Gal-haltiger Agarose eine deutlich geringere Blaufärbung auf (Abbildung 25).



**Abbildung 25. Ein-Hybrid-Assay: X-Gal-Überschichtung.**

Von jedem Stamm wurde eine Kolonie auf CSM+Uridin-Medium bei 30°C für 24h inkubiert und anschließend mit einer X-Gal-Lösung überschichtet. Der Stamm mit einer *SalexA*-*NRG1*-Fusion zeigt verminderte *lacZ*-Expression gegenüber dem Vorläuferstamm ohne Operatorsequenz. Eine Erhöhung der Expressionsrate ist bei der Fusion von *SalexA* mit dem Transkriptionsaktivator *GCN4* zu beobachten. Die *lacZ*-Expressionsrate von *SFL1*-fusioniertem *SalexA* liegt deutlich unterhalb der des Transkriptionsaktivators Gcn4 und entspricht dem des Transkriptionsrepressors Nrg1.

Eine Quantifizierung der *lacZ*-Expressionsrate erfolgte mittels ONPG-Assay. Der CAI-8 Stamm mit den beiden integrierten Plasmiden pClpSalexA und pCR-Op-lacZ zeigt eine basale Expressionsrate von 34,5 Miller-Einheiten. Eine *SalexA-NRG1*-Fusion führt zu einer verringerten *lacZ*-Expressionsrate von 16,5 Miller-Einheiten. Gcn4 hingegen führt in Fusion mit *SalexA* zu einer erhöhten Expressionsrate des Reportergens von 193 Miller-Einheiten. Eine Quantifizierung von *SFL1*-fusioniertem *SalexA* ergab Werte von 34 und 27 Miller-Einheiten. Diese Werte liegen unterhalb der Werte des Transkriptionsaktivators und des Kontrollstammes, so dass eine reprimierende Funktion von Sfl1 bezüglich der Expression angenommen werden kann. Die reprimierende Wirkung von Nrg1 als Transkriptionsrepressor kann allerdings nicht erreicht werden. Somit kann eine Funktion von Sfl1 als Transkriptionsaktivator ausgeschlossen werden. Eine Aktivität als Transkriptionsrepressor, wie Nrg1, konnte für Sfl1 nicht quantifiziert werden (Abbildung 26).

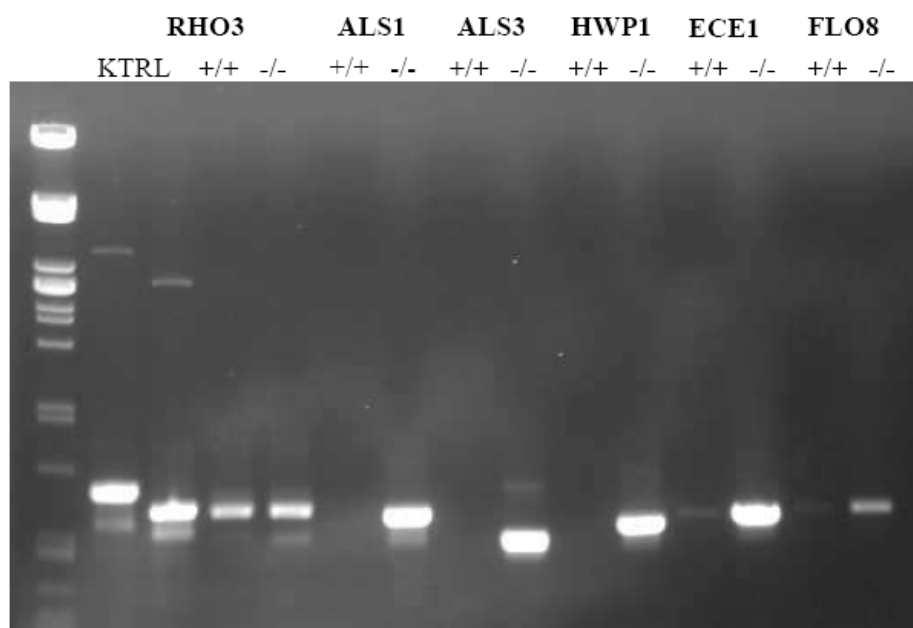


**Abbildung 26. Ein-Hybrid-Assay: Quantifizierung mit ONPG-Assay.**

Die Expressionsrate der mit *SalexA* fusionierten ORFs wurde durch einen ONPG-Assay quantifiziert. Die Expressionsrate eines mit Nrg1-fusionierten *SalexA* liegt unterhalb der des Kontrollstammes *SalexA*-lexOP. Damit ist eine reprimierende Wirkung nachgewiesen. Eine Gcn4-*SalexA*-Fusionsmutante zeigt eine deutlich höhere *lacZ*-Expressionsrate und weist damit die Funktion von Gcn4 als Transkriptionsaktivator nach. Sfl1 zeigt in Fusion mit *SalexA* keine derartig erhöhte *lacZ*-Expression, was die Funktion als Transkriptionsaktivator ausschließt.

### 3.1.12 Expressionsnachweis hyphenspezifischer Gene in der *sfl1*-Deletionsmutante

Nach Isolierung von totalRNA aus exponentiellen Zellkulturen des Wildtyp-Stammes SC5314 und der *sfl1*-Deletionsmutante aus CSM-Minimalmedium konnte mittels RT-PCR die Genexpression verschiedener hyphenspezifischer Gene überprüft werden. Zu diesen Genen gehören *ALS1*, *ALS3*, *HWP1* und *ECE1*. Das Gen *FLO8* wurde auf Expressionsunterschiede unter *sfl1*-Deletionsbedingungen getestet. Zur Kontrolle der cDNA auf DNA-Verunreinigungen während der RNA-Präparation wurde das *CaRHO3*-Gen, welches ein Intron enthält, mittels RT-PCR amplifiziert. Ein *RHO3*-Amplifikat von genomischer DNA hat eine Größe von 717bp, während ein PCR-Produkt von cDNA 626bp groß ist. Beide Fragmente konnten von den Plasmiden pCaRHO3 und pCaRHO3c amplifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass aus dem Wildtyp-Stamm SC5314 und der *sfl1*-Deletionsmutante CAJ071 DNA-freie total RNA isoliert werden konnte, da beide cDNA-Proben ein PCR-Fragment von der Größe des Genabschnitts ohne Intron liefern. In der Mutante CAJ071 konnte die Expression hyphenspezifischer Gene, wie *ALS1*, *ALS3*, *HWP1* und *ECE1*, im Vergleich zum SC5314-Stamm nachgewiesen werden. Für die Amplifikation der Fragmente wurden jeweils interne Oligonukleotidprimer I1 und I2 verwendet, die 3'terminal lokalisiert sind und Fragmentgrößen von 589bp für *ALS1*, 481bp für *ALS3*, 546bp für *HWP1* und 590bp für *ECE1* liefern. Ebenso konnte die Expression von *FLO8* in der *sfl1*-Deletionsmutante gezeigt werden. Das PCR-Produkt für *FLO8* hat eine Größe von 611bp (Abbildung 27).



**Abbildung 27. Genexpression hyphenspezifischer Gene in *sfl1*-Deletionsmutante.**

Mittels RT-PCR konnte die Genexpression von *ALS1*, *ALS3*, *HWP1* und *ECE1* in der *sfl1*-Deletionsmutante CAJ071 (-/-) im Vergleich zum Wildtyp-Stamm SC5314 (+/+) in CSM-Minimalmedium nachgewiesen werden. *CaFLO8* ist in der Mutante stärker exprimiert als in SC5314.

### 3.2 Analyse der ALS-Genfamilie

#### 3.2.1 ALS-Promotorbindestellen von CaSfl1

Der N-Terminus des Sfl1 aus *S. cerevisiae* hat eine hohe Sequenzähnlichkeit zu DNA-Bindedomänen von Hitzeschockfaktoren (Fujita *et al.*, 1989). Für die Bindung von Hitzeschockfaktoren an DNA ist das konservierte Sequenzmotiv 5'-AGAA-N<sub>x</sub>-TTCT-3' als Bindesequenz beschrieben worden (Conlan und Tzamarias, 2001). Eine Regulation der ALS-Gene durch das *C. albicans* Sfl1 wird vermutet und daher wurden die Promotorsequenzen der ALS-Gene auf diese palindromische Sequenz hin untersucht. Ebenso wurden die Gene der Adhäsine *Eap1* und *Hwp1* auf das Vorhandensein einer solchen Sequenz hin überprüft.

Das Sequenzmotiv konnte in unterschiedlicher Anzahl in den stromaufwärts gelegenen Sequenzbereichen von -1000bp bis 0bp vor dem Startkodon gefunden werden. Dabei ist in der Promotorregion von *ALS6* mit sieben dieser Sequenzmotive die häufigste Anzahl vorhanden. *ALS1* und *ALS7* besitzen jeweils sechs dieser Motive. Vier palindromische Sequenzbereiche waren bei *ALS9* zu finden. Das weiter untersuchte *ALS3*-Gen besitzt drei Sequenzmotive, wie auch *ALS2*, *ALS4*, *HWPI* und *EAPI*. Nur eine dieser Konsensussequenz war bei *ALS5* zu finden (Abbildung 28).

Diese Sequenzmotive deuten auf eine mögliche Bindung von *Sfl1* oder anderen DNA-Bindeproteinen mit gleichem DNA-Bindemotiv hin. Durch die unterschiedliche Anzahl dieser Konsensussequenz in den jeweiligen Promotorbereichen ist eine verschieden starke Genrepression der einzelnen Gene durch die Bindung eines Transkriptionsrepressors an diese Sequenzen zu vermuten. Allerdings ist auch eine statistische Verteilung der Sequenzen AGAA und TTCT zu berücksichtigen. Eine aus vier Basen bestehende Sequenzabfolge kommt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 zu 4<sup>4</sup> Basen vor, was bedeutet, dass dieses Motiv in einer 256bp langen Abfolge einmal vorkommen könnte. Demnach könnten die Motivsegmente bei dem untersuchten stromaufwärts gelegenen Bereich von 1000bp etwa viermal vorkommen.

### 3. Ergebnisse

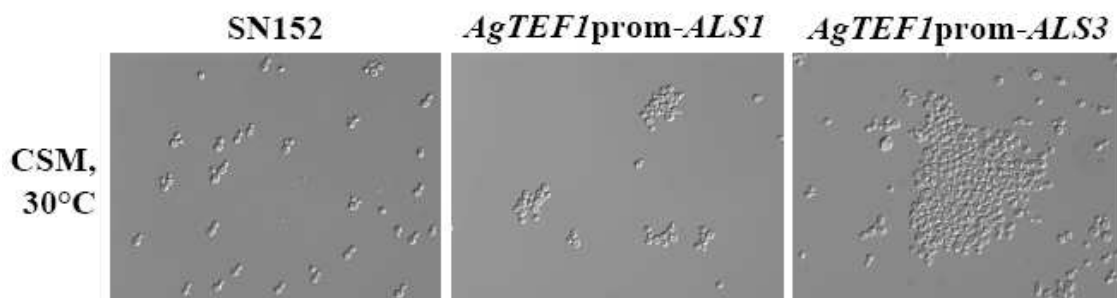
[illegible]

**Abbildung 28. Potentielle *SFLI*-Bindestellen im Promotorbereich der *ALS*-Gene**

Die Promotorbereiche der Gene *ALS1*-*ALS7*, *ALS9*, *EAP1* und *HWPI* von -1000 bis 0bp vor dem Starkodon wurden auf die Konsensussequenz 5'-AGAA-N<sub>x</sub>-TTCT-3' hin überprüft. Diese Sequenz kommt in unterschiedlicher Häufigkeit in den einzelnen stromaufwärts gelegenen Sequenzen. Die Konsensussequenzen sind grau unterlegt.

### 3.2.2 Überexpression von *ALS1* und *ALS3*

Eine Transkriptanalyse der *sfl1*-Deletionsmutante CAJ071 ergab den Beleg für eine Expression der hyphenspezifischen Gene *ALS1* und *ALS3*. Eine Überexpression von *ALS1* und *ALS3* sollte Aufschluss über den Einfluss dieser beiden Gene am Phänotyp der *sfl1*-Deletionsmutante geben. Zunächst konnten die offenen Leserahmen (open reading frame, ORF) der beiden Gene über [www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org) identifiziert werden. Der orf19.5741, der für ein Zelloberflächenglykoprotein kodiert, ist mit *ALS1* bezeichnet. Der orf19.1816 kodiert für Als3, ein GPI-verankertes Zellwandprotein. Für die Überexpression wurden über PCR-generierte Promotor-Fusions-Kassetten in den Stamm SN152 transformiert und die Integration des *AgTEF1*-Promotors vor den ORF des entsprechenden Gens verifiziert. Hierbei konnten die Mutanten CAJ110 und CAJ111 *AgTEF1*prom-*ALS1*, sowie CAJ112 und CAJ113 *AgTEF1*prom-*ALS3* generiert werden. Dabei wurde für eine *ALS1*-Überexpression keine starke Beeinflussung der Zell-Zell-Adhäsion beobachtet. Eine Überexpression von *ALS3* hingegen führte zu starken Zellaggregationen (Abbildung 29).



**Abbildung 29. Überexpression von *ALS1* und *ALS3***

Durch PCR-generierte Promotorfusion konnte eine Überexpression von *ALS1* und *ALS3* generiert werden. *AgTEF1*prom-*ALS1* zeigt kaum Zelladhäsion im Vergleich zum Vorläuferstamm SN152. *AgTEF1*prom-*ALS3* hingegen zeigt starke Zellaggregation.

### 3.3 Identifizierung der *TLO*-Genfamilie in *Candida albicans*

#### 3.3.1 Genomanalyse bezüglich *TLO*-Lokalisierung und -Identität

*Candida albicans* besitzt eine Genfamilie, die *CTA2*-Genfamilie, die durch Zwei-Hybrid-Versuche mit *S. cerevisiae* entdeckt wurde (Kaiser *et al.*, 1999). Eine Suche nach diesen Genen in der Genomdatenbank resultierte in der Identifikation von zunächst 17 *CTA2*-Genen. Diese weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander auf und sind telomernah lokalisiert. Die derzeitige Annotierung des *C. albicans*-Genoms, die Assemblierung 20, beschreibt 14 verschiedene Gene dieser Genfamilie (Tabelle 5). Aufgrund ihrer Lokalisierung wurden diese Gene als *TLO*-Gene (Telomere-associated), *TLO1* bis *TLO5*, *TLO6* bis *TLO13*, sowie *TLO16* und *TLO34*, neu benannt (van het Hoog *et al.*, 2007). Die zuvor als *CTA2* identifizierten offenen Leserahmen, orf19.2295 und orf19.3386, wurden in der neuen Assemblierung deletiert und orf19.631 wurde dem Gen *TLO34* zugeordnet. Über eine Bezeichnung auf einem DNA-Chip (Eurogentec) wurde eine weitere Annotierung für ein *CTA2*-Gen, orf19.381, identifiziert. Dieser ORF resultierte ebenfalls in einer Zuordnung zu *TLO34*. Zwei weitere Genbezeichnungen des DNA-Chip weisen auf orf19.5699.1 und orf19.6190.2 hin. Diese sind allerdings in der aktuellen Genomannotierung nicht beschrieben. Die *CTA2*-Gene, die mittels DNA-Chip identifiziert wurden, zeigten eine zweifach erhöhte Expressionsrate in Hyphenzellen im Vergleich zu Hefezellen (Sickinger und Wendland, unveröffentlicht).

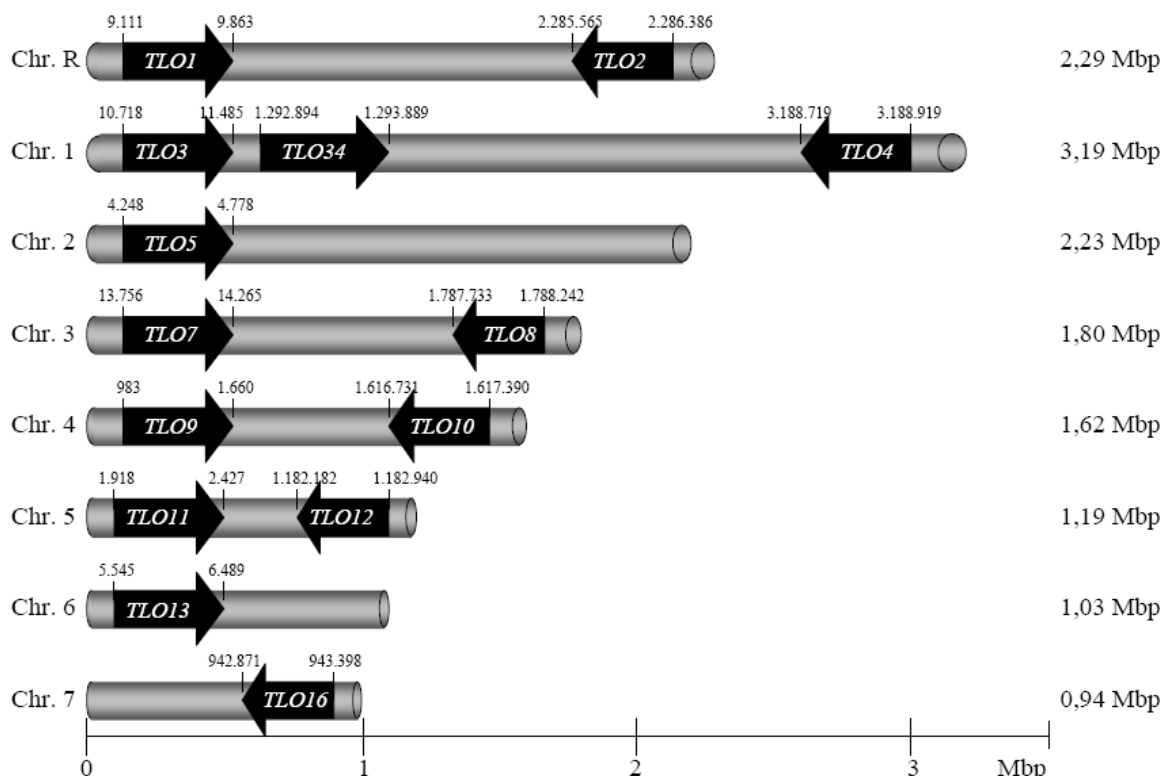
**Tabelle 5. Auflistung aller *TLO*-Gene**

Gen	alte Bez.	DNA-Chip	ORF	Länge [bp]	Chrom.	Position
<i>TLO1</i>	<i>CTA2</i>		19.7544	753	R	9111 - 9863
<i>TLO2</i>	<i>CTA26</i>	CA6059	19.7680	822	R	2286386 -
<i>TLO3</i>	<i>CTA2</i>	CA3851	19.6112	768	1	10718 - 11485
<i>TLO34</i>	<i>CTA2.3</i>		19.2661	996	1	1292894 -
<i>TLO4</i>	<i>CTA24</i>	CA5387	19.7276-1	201	1	3188919 -
<i>TLO5</i>	<i>CTA-2-10</i>		19.1925	531	2	4248 - 4778
<i>TLO7</i>	<i>CTA2</i>		19.5467	510	3	13756 - 14265
<i>TLO8</i>	<i>CTA2</i>		19.6191	510	3	1788242 -
<i>TLO9</i>	<i>CTA2</i>	CA0050	19.362	678	4	983 - 1660
<i>TLO10</i>	<i>CTA2</i>	CA0602	19.3074	660	4	1617390 -
<i>TLO11</i>	<i>CTA2</i>	CA2615	19.5700	510	5	1918 - 2427
<i>TLO12</i>	<i>CTA2</i>		19.4054	759	5	1182940 -
<i>TLO13</i>	<i>CTA28</i>		19.6337	945	6	5545 - 6489
<i>TLO16</i>	<i>CTA2.5</i>		19.7127	528	7	943398 - 942871
<i>TLO34</i>	<i>CTA2</i>		19.631	996	1	
deletiert	<i>CTA2</i>		19.2295	525	?	
deletiert	<i>CTA2</i>		19.3386	450	?	
<i>TLO34</i>		CA0078	19.381	381	1	

Aufgelistet sind alle *TLO*-Gene mit der ORF-Bezeichnung, der Länge und ihrer Position im Genom. Ebenso sind die Annotierungen für *CTA2* aus der Assemblierung 19 gezeigt.



Die telomernah lokalisierten *TLO*-Gene sind bezüglich ihres Leserasters in Centromerrichtung orientiert, das heißt, das Startkodon ist jeweils in Richtung Telomer angeordnet. Anhand der Positionierung im Chromosom lässt sich feststellen, dass die *TLO*-Gene weniger als 20kbp vom Telomerende entfernt sind. *TLO34* liegt abweichend nicht telomernah, weist allerdings eine identische Ausrichtung der Transkriptionsrichtung auf (Abbildung 30). Des Weiteren sind im 5'-Bereich der *TLO*-Gene die repetitiven CARE-2 Sequenzen lokalisiert (van het Hoog *et al.*, 2007).



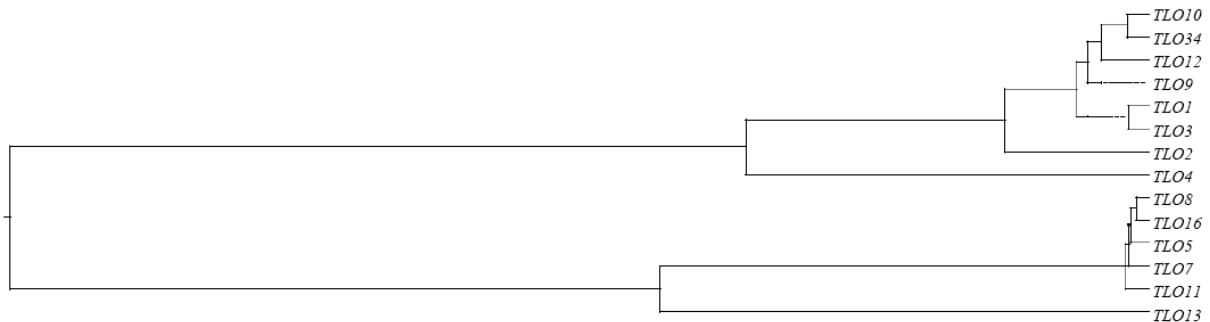
**Abbildung 30. Schema der Lokalisierung der *TLO*-Gene auf Chromosomen**

Die *TLO*-Gene sind jeweils nahe am Telomerende der Chromosomen mit dem Startkodon am Telomerende und in Transkriptionsrichtung zum Centromer lokalisiert. Das Gen *TLO34* stellt eine Ausnahme dar, es ist nach dem *TLO3* in Richtung Centromer lokalisiert. Angegeben sind jeweils die Positionen im Chromosom und die Chromosomenlänge.

Die Tlo-Proteine weisen untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit von bis zu 98,5% auf. Ein Vergleich der Tlo-Proteinsequenzen zeigt sehr hohe Ähnlichkeiten im C-Terminus. Durch eine zusätzliche C-terminale Sequenz ist Tlo34 das längste Tlo-Protein mit einer Länge von 331 Aminosäuren. Im mittleren Bereich der Proteine befinden sich repetitive Sequenzen, die vorwiegend aus den basischen Aminosäuren Arginin (A) und Lysin (K) und der sauren Aminosäure Glutaminsäure (E) bestehen. Diese Sequenzen sind allerdings in unterschiedlicher Anzahl bei den einzelnen Tlo-Proteinen vorhanden. Des



weitere Versuche wurden die Gene *TLO3* und *TLO8* ausgewählt, die jeweils einem ORF einer Gruppierung entsprechen.

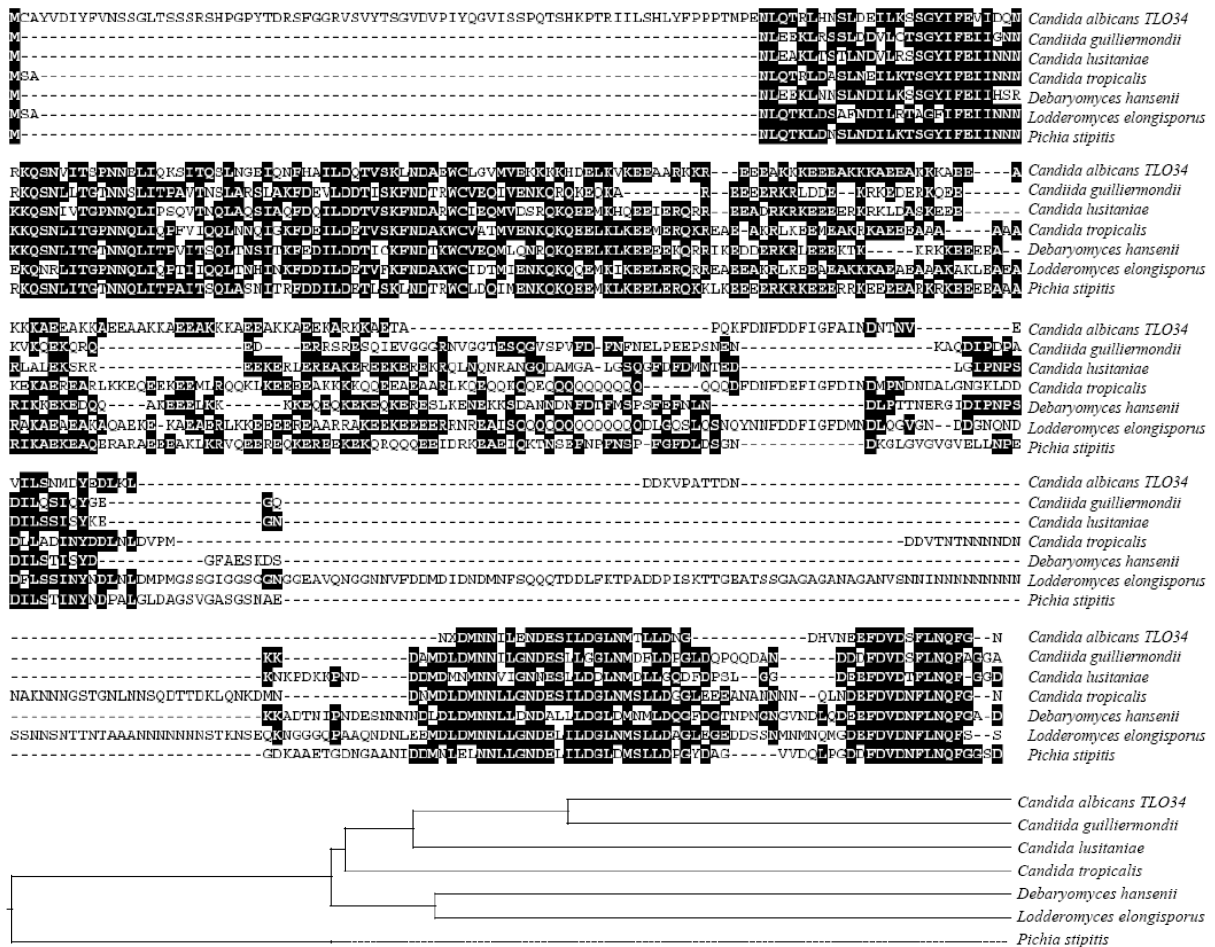


**Abbildung 32. Gruppierung der *TLO*-Gene**

Die *TLO*-Gene können in zwei Gruppierungen eingeteilt werden, die sich aus einem DNA-Sequenzvergleich ergeben. Dabei bildet sich die erste Gruppe aus den Genen *TLO10*, *TLO34*, *TLO12*, *TLO9*, *TLO1*, *TLO3* und *TLO2*. Eine weitere Gruppe besteht aus den Genen *TLO8*, *TLO16*, *TLO5*, *TLO7* und *TLO11*. Die Gene *TLO13* und *TLO4* weisen Besonderheiten in ihren Sequenzen auf, die zu einer abweichenden Einteilung führen.

### 3.3.2 Identifizierung von *TLO*-Genen in anderen Spezies

In verwandten Spezies sind zu den *TLO*-Genen identische Gene vorhanden. In *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii* und *Lodderomyces elongisporus* wurde jeweils ein homologes Gen über die Homepage des Broad-Instituts in Cambridge, USA ([www.broad.mit.edu](http://www.broad.mit.edu)) identifiziert. Eine Suche mit Hilfe des National Center for Biotechnology ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ergab sequenzähnliche Proteine in *Debaryomyces hansenii* und *Pichia stipitis*. Es wurden jeweils ähnliche Proteinsequenzen identifiziert, bei denen es sich um hypothetische Proteinsequenzen handelt, deren Lokalisierung aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Genomsequenzierungen nicht eindeutig festgelegt werden kann. Allerdings befinden sich die Gene 45Kb bis 580Kb vom Ende eines Supercontigs entfernt, so dass ein ähnliches, telomernahes Lokalisierungsschema wie bei den *C. albicans* *TLO*-Genen ausgeschlossen werden kann. Die Proteinsequenzen weisen eine Identität von bis zu 36% mit dem *TLO34* von *C. albicans* auf, wobei die identische Sequenz in *Candida tropicalis* die größte Ähnlichkeit aufweist. Alle Proteinsequenzen besitzen eine N-terminale und eine C-terminale Homologieregion. Ebenso befinden sich im mittleren Bereich der Proteine die EAK-Aminosäuren, die bei den *Candida albicans* Tlo-Proteinen in mehrfacher Wiederholung vorkommen (Abbildung 33).

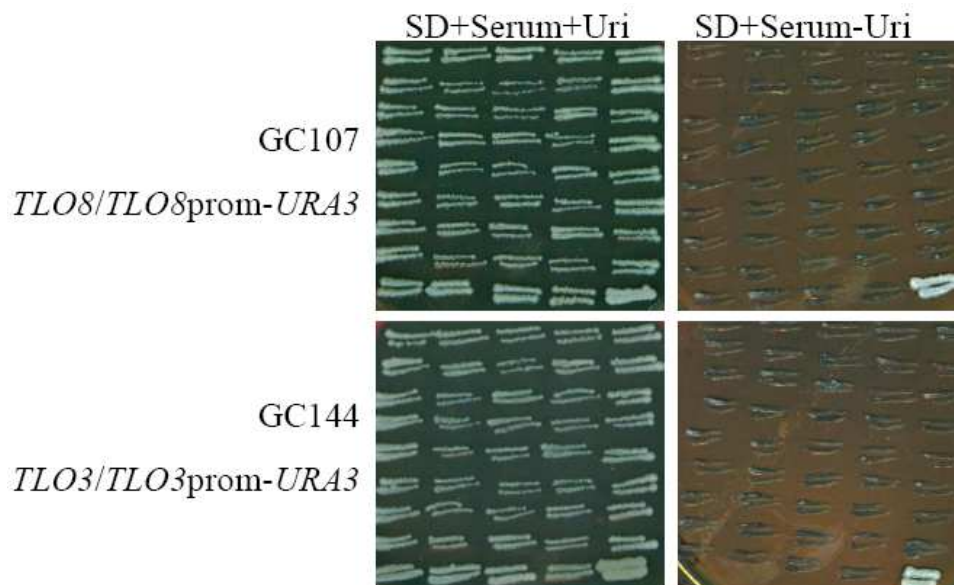


### 3.3.3 Sequenzierung einzelner TLO-Gene

Für die Analyse der TLO-Gene wurden zunächst PCR-Fragmente der Gene *TLO3*, *TLO34* und *TLO8* amplifiziert und in das Plasmid pDrive ligiert. Dabei entstanden die in Tabelle 2 aufgelisteten Plasmide. Diese DNA-Sequenzen wurden sequenziert und für weitere Versuche verwendet. Das Plasmid #688 pDrive-TLO8-P3B-P2B trägt den *TLO8*-Promotor, der zur Fusion mit dem LacZ-ORF und der Integration in *C. albicans* genutzt wurde. Mit diesen Fusionsmutanten wurden Expressionstudien in Hefe- und Hyphenzellen durchgeführt (Martin und Bauer, unveröffentlicht). Das *TLO8*-Promotorfragment diente der Herstellung einer Fusion mit dem *TUP1*-ORF, so dass das Plasmid #C87 pSK+TLO8prom-TUP1orf-URA3-TLO8-Cterm entstand (Martin, 2007). Ebenso wurde dieser Promotor für die Fusion mit dem URA3-ORF verwendet, so dass nach Transformation in *C. albicans* der Stamm GC107 *TLO8/TLO8prom-URA3* entstand (Martin und Wendland, unveröffentlicht).



Die erhaltenen 5-FOA-selektierten *ura3<sup>-</sup>*-Kolonien wurden auf Uridin-Mangelmedium übertragen, um eine Wiederherstellung des *URA3*-Status zu detektieren. Zur Kontrolle wurden die Kolonien ebenfalls auf Medium mit Uridin ausgestrichen. Dieser Vorgang wurde für jeweils 500 Kolonien eines Stammes viermal wiederholt, um eine Expression des *URA3*-ORF nach Replikation zu ermöglichen. Die Kolonien wurden bei 37°C und auf serumhaltigem Medium inkubiert, da eine Initiation der Expression bei diesen Bedingungen zu erwarten war. Keine dieser Kolonien zeigte nach mehrfacher Übertragung und Inkubation auf Uridin-Mangelmedium eine Regeneration des *URA3*-Status (Abbildung 35). Eine Expression des *URA3*-ORF konnte auf diesem Weg nicht wieder hergestellt werden, demnach handelt es sich nicht um Genstilllegung am Telomer (telomeric silencing).

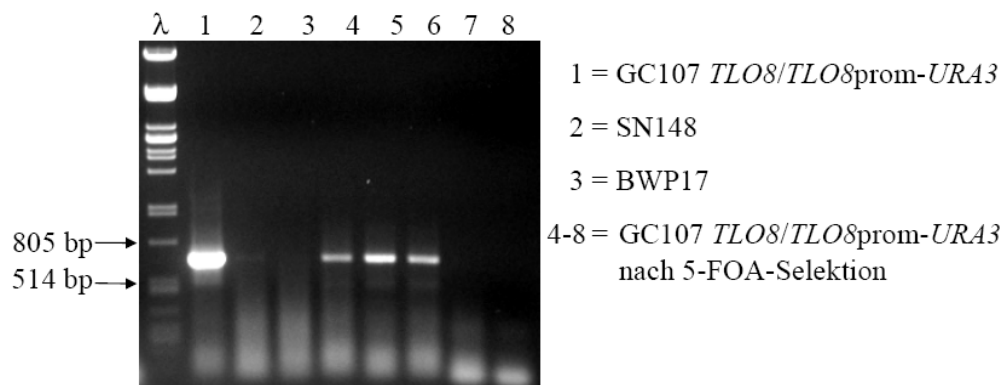


**Abbildung 35. Testung des Ura-Status der mit 5-FOA selektierten Mutanten**

Mittels 5-FOA selektierte Kolonien der Stämme GC107 *TLO8/TLO8prom-URA3* und GC144 *TLO3/TLO3prom-URA3* wurden mehrmals auf SD-Medium mit und ohne Zusatz von 40µg/ml Uridin übertragen. Nach viermaligem Transfer und der Inkubation für jeweils 24h bei 37°C konnten keine Kolonien mit intaktem *URA3*-Gen auf SD-Medium ohne Uridin selektiert werden. Zur Wachstumskontrolle auf Uridin-Mangelmedium wurde der Wildtypstamm SC5314 mitgeführt (unten rechts).

Die mit 5-FOA selektierten Kolonien wurden anschließend mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des *URA3*-ORF hin getestet. Dabei konnte ein 666bp Fragment des *TLO8*-Promotors mit dem *URA3*-ORF mit den Oligonukleotiden P5-B und *URA3*-intern-up amplifiziert werden (Abbildung 36). Damit wurde nachgewiesen, dass der *URA3*-ORF nach Selektion mit 5-FOA noch im Genom vorhanden ist und zudem wurde auch die Fusion mit dem *TLO8*-Promotor gezeigt. Für einen Teil der Kolonien konnte diese Fusion nicht durch Kolonie-PCR gezeigt werden. Eine Deletion dieser *TLOprom-URA3*-Fusion

durch den Verlust der Heterozygotie oder eine Rekombination innerhalb des Genoms ist möglich.

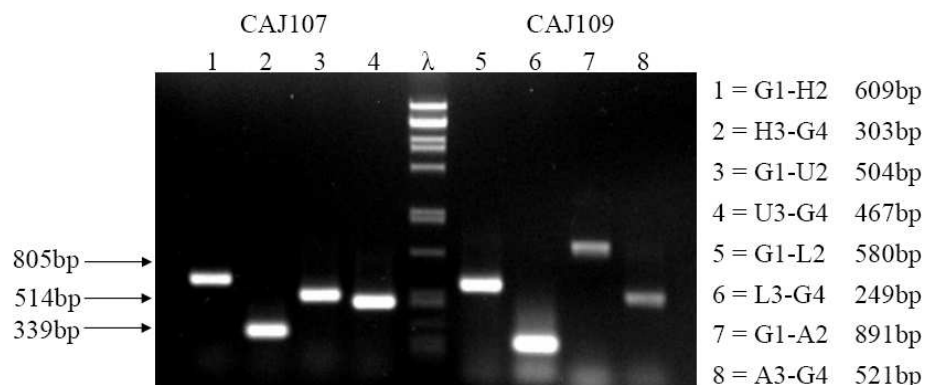


**Abbildung 36. Kolonie-PCR von GC107 nach 5-FOA-Selektion**

Von Kolonien der Stämme GC107 *TLO8/TLO8prom-URA3*, SN148 und BWP17 und von GC107 nach 5-FOA-Selektion wurden PCR-Reaktionen angesetzt, die Fragmente der *TLO8*-Promotor-*URA3*-Fusion zeigen. Dabei wurden die Primer P5-B und *URA3* intern up verwendet, so dass ein 666bp großes Fragment entstand.

### 3.3.5 Die Deletionsmutante *TLO34*

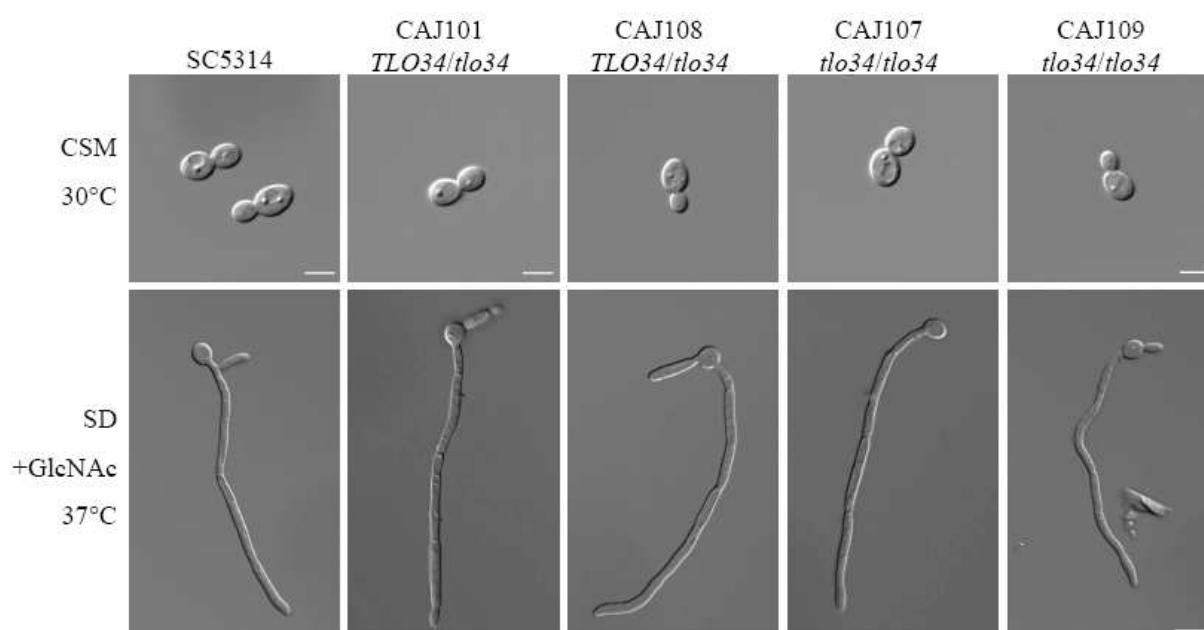
Mittels PCR-basierter Gendisruption konnten beide Allele des Gens *TLO34* deletiert werden. Hierzu wurden Disruptionskassetten mit den Aminosäuremarkern *CdHIS1*, *CmLEU2* und *ARG4*, sowie *URA3* verwendet. Es entstanden die *tlo34*-Deletionsmutanten CAJ107 *tlo34::CdHIS1/tlo34::URA3* und CAJ109 *tlo34::CmLEU2/tlo34::ARG4*, die mittels Kolonie-PCR auf korrekte Integration der Markergene verifiziert werden konnten (Abbildung 37). Eine Überprüfung der Gendisruption mittels interner DNA-Fragmente ist durch die hohe Sequenzähnlichkeit der *TLO*-Gene untereinander nicht möglich.



**Abbildung 37. Verifizierung der *tlo34*-Deletionsmutanten**

Mittels Kolonie-PCR konnten die korrekten Integrationen der Disruptionskassetten in den *TLO34*-Ziellokus bei den *tlo34*-Deletionsmutanten CAJ107 *tlo34::CdHIS1/tlo34::URA3* und CAJ109 *tlo34::CmLEU2/tlo34::ARG4* nachgewiesen werden.

Die *tlo34*-Deletionsmutante wurde mikroskopisch auf die Fähigkeit hin, Hyphenzellen auszubilden, untersucht. Der *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314, die heterozygoten Mutanten und die *tlo34*-Deletionsmutanten zeigten zunächst bei Inkubation in SD-Medium bei 30°C eine Wildtyp-ähnliche Hefezellmorphologie. Ebenso zeigten sie eine Ausbildung von Hyphenzellen in SD-Medium mit 0,5g/l N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Inkubation bei 37°C. Die Zellen entsprechen in ihrer Länge und Morphologie der Form einer Wildtyp-Hyphenzelle. Somit kann eine Auswirkung der *TLO34*-Deletion auf Hefezellmorphologie und die Fähigkeit zur Hyphenzellbildung ausgeschlossen werden (Abbildung 38).



**Abbildung 38. Zellmorphologie der *tlo34*-Deletionsmutante**

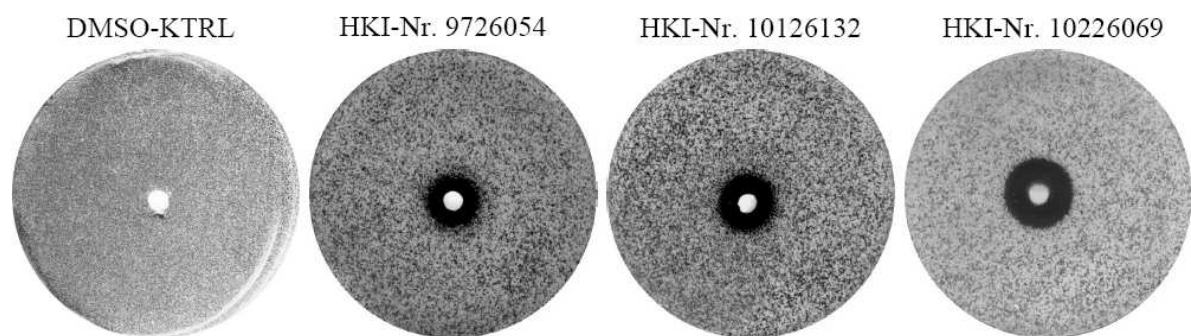
Der *C. albicans* Wildtyp-Stamm, die heterozygoten Mutanten CAJ101 und CAJ108, sowie die *tlo34*-Deletionsmutanten zeigen bei Inkubation in SD-Medium bei 30°C eine wildtypähnliche Hefezellmorphologie. In SD-Medium mit 0,5g/l N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Inkubation bei 37°C wurde eine normale Hyphenzellbildung beobachtet. Größenbalken 10µm.



### 3.4 Testung antifungaler Substanzen

#### 3.4.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen

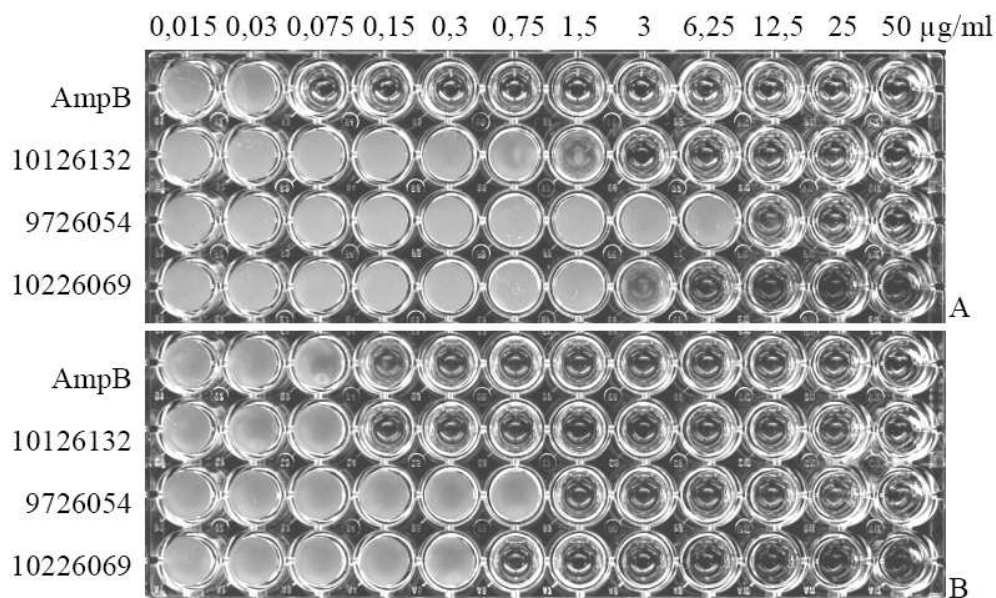
Zur Bestimmung einer antifungalen Wirkung der Substanzen HKI-Nr. 9726054, 10126132 und 10226069 wurden zunächst Hemmhoftests mit *C. albicans* durchgeführt. Hierbei ergab sich eine antifungale Wirkung aller drei Substanzen auf *C. albicans*, allerdings in unterschiedlicher Ausprägung. Die Substanz Nr. 9726054 zeigt unter den definierten Bedingungen einen Hemmhof von 4mm, Substanz Nr. 10126132 einen Hemmhof von 5mm und Substanz Nr. 10226069 einen Hemmhof von 7mm Durchmesser. Die Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO zeigte keine wachstumshemmende Wirkung, so dass die antifungale Wirkung der drei Substanzen bestätigt werden konnte. Die Wirkeffizienz scheint bei allen drei Substanzen ähnlich, allerdings zeigt Substanz Nr. 10226069 mit dem größten Hemmhof von 7mm die beste Wirkung gegen *C. albicans* (Abbildung 39).



**Abbildung 39. Hemmhof test antifungaler Substanzen**

Die Substanzen HKI-Nr. 9726054, 10126132 und 10226069 zeigen die Ausbildung eines Hemmhofes in einem Zellrasen des *C. albicans* Wildtyp-Stammes SC5314. Substanz Nr. 9726054 zeigt einen Hemmhof von 4mm, Substanz Nr. 10126132 einen 5mm Hemmhof und Substanz Nr. 10226069 einen Hemmhof 7mm. Als Kontrollansatz diente das Lösungsmittel DMSO.

Des Weiteren wurden die minimalen Hemmkonzentrationen der antifungalen Substanzen durch Titerbestimmung mittels Verdünnungsreihe bestimmt. Hierbei ergaben sich unterschiedliche minimale Hemmkonzentrationen der antifungalen Substanzen. Die minimalen Hemmkonzentrationen für Substanz Nr. 10126132 liegen bei  $3\mu\text{g/ml}$  für *C. albicans* SC5314 und bei  $0,15\mu\text{g/ml}$  für *S. cerevisiae*. Die Substanz Nr. 9726054 zeigt Wachstumshemmung ab  $12,5$  bzw.  $1,5\mu\text{g/ml}$  und Nr. 10226069 weist Werte von  $6,25$  und  $0,75\mu\text{g/ml}$  für die minimale Hemmkonzentration auf. Die Kontrollsubstanz Amphotericin B besitzt bei den definierten Bedingungen eine minimale Hemmkonzentration von  $0,075$  bzw.  $0,15\mu\text{g/ml}$  (Abbildung 40). Die niedrigeren Hemmkonzentrationen der Testsubstanzen bei *S. cerevisiae* könnten durch die Verwendung des auxotrophen Stammes BY4741 bedingt sein. Das verwendete YNB+CSM-Medium ist ein Minimalmedium, das alle erforderlichen Aminosäuren enthält, dennoch ist ein langsames Wachstum des auxotrophen *S. cerevisiae*-Stammes gegenüber dem *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 anzunehmen. Die Aminosäuren Histidin, Leucin, Methionin und die Pyrimidinbase Uracil müssen von dem Stamm BY4741 aus dem Medium aufgenommen werden, da diesem Stamm die entsprechenden Synthesegene fehlen.

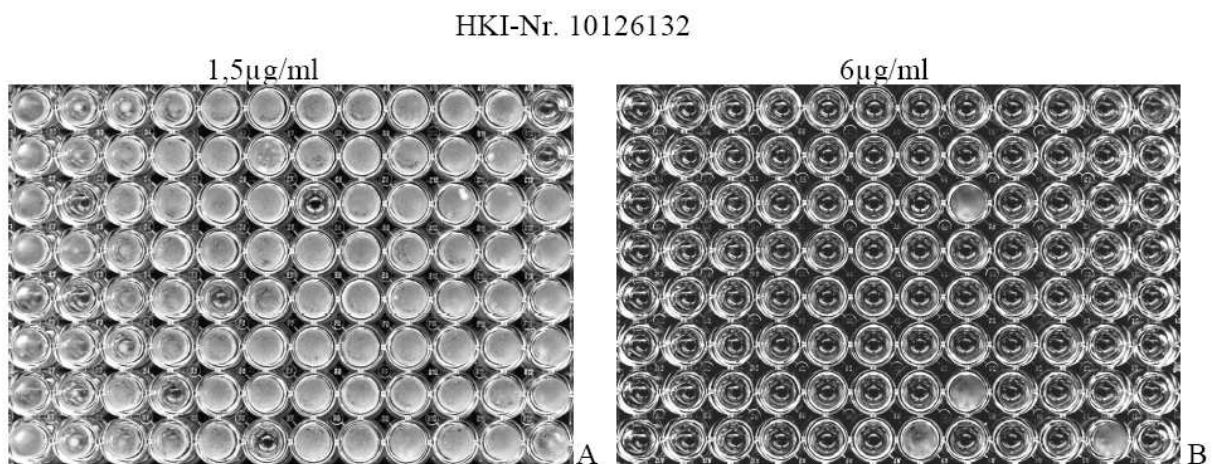


**Abbildung 40. Minimale Hemmkonzentrationen der antifungalen Substanzen**

Die Substanzen zeigen unterschiedliche minimale Hemmkonzentrationen nach Inokulation der in YNB+CSM-Medium 1:2 verdünnten Substanzen mit  $10\mu\text{l}$  einer Zellkultur mit einer optischen Dichte von  $\text{OD}_{600}=0,1$  und 48h Inkubation. Die minimalen Hemmkonzentrationen der Substanzen entsprechen der niedrigsten Konzentration ohne sichtbares Zellwachstum bei *C. albicans* SC5314 (A) und *S. cerevisiae* BY4741 (B). Als Kontrollsubstanz diente Amphotericin B (AmpB).

### 3.4.2 Identifikation sensibler und resistenter Deletionsmutanten mit der *Saccharomyces cerevisiae*-Deletionsstammbank

Die erhaltenen minimalen Hemmkonzentrationen wurden für die Testung der antifungalen Substanzen mit der *S. cerevisiae*-Deletionsstammbank verwendet. Für die Identifikation sensibler Deletionsstämme wurden jeweils die halbe minimale Substanzhemmkonzentration verwendet, so dass es zur Wachstumsinhibierung einzelner, als sensitiv bezeichneter, Stämme kam (Abbildung 41A). Die Inkubation der Deletionsstämme mit zweifacher minimaler Hemmkonzentration der Substanzen führte zur Identifikation resistenter Deletionsmutanten. Dies führte zu einer Wachstumsinhibierung der meisten Deletionsmutanten und der Vermehrung einzelner Stämme, die trotz erhöhter Wirkkonzentration sichtbares Wachstum zeigten (Abbildung 41B).



**Abbildung 41. Identifizierung sensibler und resistenter Deletionsmutanten**

Die Substanz Nr. 10126132 wurde mit Konzentrationen von 1,5 und 6 µg/ml an der Deletionsstammbank von *S. cerevisiae* getestet. Die 96-Loch Mikrotiterplatten wurden mit 10 µl Vorkultur beimpft und 24h bei 30°C und 400U/min auf einem Inkubationsschüttler inkubiert. Dabei konnten sensitive (A) und resistente (B) Stämme identifiziert werden. Gezeigt ist Mikrotiterplatte Nr. 31.

Die erhaltenen resistenten und sensiblen Deletionsmutanten aller drei Substanzen wurden anhand der Stammsammlungsdaten identifiziert, isoliert und wiederholt getestet. Die erhaltenen reaktiven *S. cerevisiae*-Stämme sind in Tabelle 6 aufgelistet. Eine Auflistung aller beschriebenen Gene mit Ihren Funktionen befindet sich im Anhang. Zumeist wurden Deletionsmutanten identifiziert, deren Gene für Zellmembranproteine, wie *Las21* und *Atg2*, aber auch für Vakuolenmembranproteine, wie *Vac7*, deletiert waren. Diese Membranproteine könnten also mögliche Angriffspunkte der Substanzen sein. Die Identifikation sensibler Deletionsmutanten zeigte ein entsprechend vermindertes Wachstum der *erg6*-Deletionsmutante bei Testung der Substanz Nr. 10126132. *ERG6*

kodiert für die Delta(24)-sterol C-methyltransferase, einem Enzym der Ergosterolbiosynthese. Da eine Deletion dieses Gens zu Sensitivität des Stammes gegenüber der Substanz führt, ist eine Funktion der Substanz Nr. 10126132 als Sterolbiosyntheseinhibitor möglich. Des Weiteren sind Deletionsstämme mit einer Deletion für die Vakuolenmembranproteine Vma7, Pep3, Ppa1, Vph2 und für Vakuolen-assoziierte Proteine, wie Vps33 und Vps1, sensitiv für die Substanz Nr. 10126132. Für die Substanzen Nr. 10226069 und Nr. 9726054 konnten ebenfalls Deletionsstämme mit Defekten in Vakuolenmembranproteinen, wie Vma13, sowie Yvc1, Vps17, Vma13, Pep3 und Vph2 als sensitive Mutanten identifiziert werden. Die erhöhte Sensitivität dieser Deletionsmutanten deutet auf die Detoxifizierung und Ausschleusung der Substanzen in die Vakuole hin. Eine weitere sensitive Deletionsmutante ist defekt für den Multidrug-Transporter Flr1, der in den Efflux von Fluconazol, Benomyl und anderen Antimykotika involviert ist. Für Substanz Nr. 10226069 wurde das Gen *KAP122*, ein Gen für die Regulation pleiotropischer Antimykotika-Resistenz, als sensitive Mutation identifiziert.

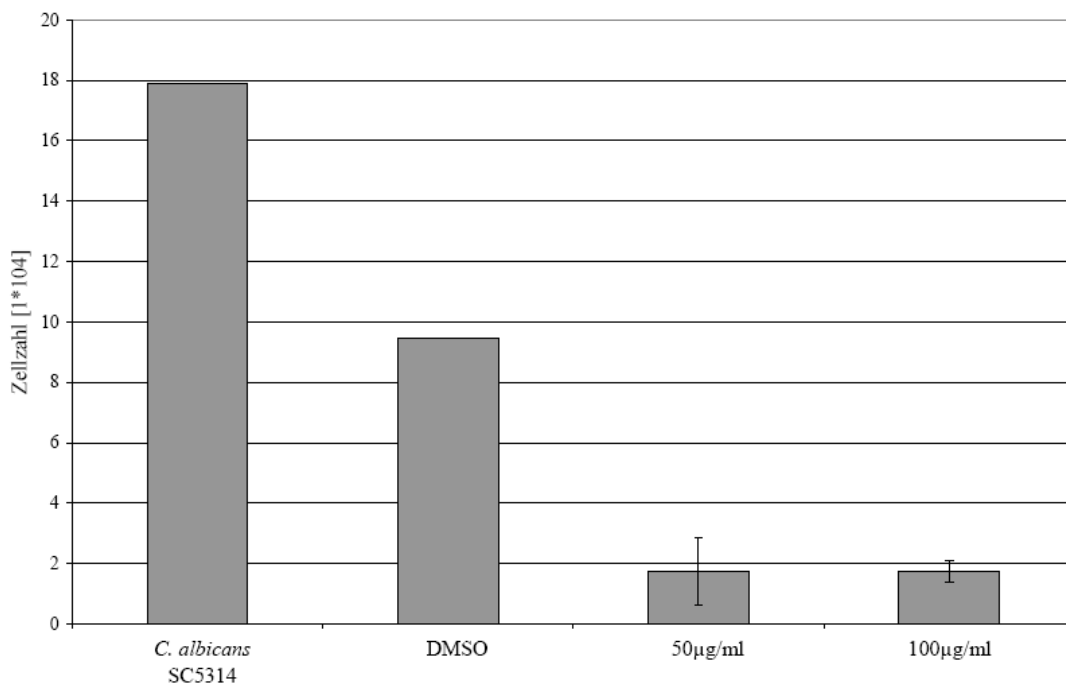
Tabelle 6. Auflistung resistenter und sensibler Deletionsmutanten

Substanz	deletierte Gene resistenter Deletionsmutanten	deletierte Gene sensibler Deletionsmutanten
10126132	<i>YHR126C, YMR206W, ELM1, MAL13, YEL020C, SPT21, YMR206W, YOL085C</i>	<i>CCR4, SWE1, ERG6, SOK2, HOF1, URE2, YNL193W, PET123, SER1, SNF2, TAF14, RVS161, SIR2, DHH1, ARF1, NGG1, VID21, GET2, ILV1, YDR401W, VPSS2, MRP17, OPI3, ADO1, VMA5, PDC1, PEP3, PPA1, LYP1, MRPL10, RBK1, GSH1, VPH2, VPS1, VPS34, YLR352W, VPS33, DOM34</i>
9726054	<i>EAF5, URM1, YIL029C, LAS21, ATG2, ZWF1, VAC7, YNL187W, MPD1, MEK1, RTG1, TCO89, LPD1, YGR149W, SVL3</i>	<i>IST3, YIL029C, ICE2, ZWF1, STD1, CUE5, YVC1, VPS17, ARP8, HNT3, PET123, SER1, PRO2, YOR366W, HTZ1, HRD1, SIN3, GSH2, VMA13, YBL094C, FLR1, CBP6, RPS11B, YBR147W, HIS7, RVS161, CRD1, BUD30, DHH1, MRPL1, ARG82, NGG1, PEP3, GSH1</i>
10226069	<i>YIL054W, RSM25, MDM20, SAM4, YBR209W, NHP10, PRM7, STP4, ECM29, PTM1, VPS24, BUD2, BIO2, MAL13, SWI4, STB2</i>	<i>CCR4, VMA13, DHH1, CAX4, UME6, IZH1, KAP122, GET1, PGD1, CYS4, GSH1, VPH2</i>

Für jede Substanz wurden sensitive und resistente *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten mit halber und zweifacher minimaler Hemmkonzentration der jeweiligen Substanz ermittelt.

### 3.4.3 Wirkungsnachweis der Substanzen auf Darmepithel

Eine weitere antifungale Substanz mit der HKI-Nr. 9762047 wurde mittels eines Schweinedarmepithel-Assay (porcine intestinal epithelium (PIE)-Assay) auf ihre Wirkung an Gewebe getestet (Wendland *et al.*, 2006). Für diesen Versuch wurden ca. 50cm<sup>2</sup> große Blinddarmepithelstücke mit dem *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314 inkubiert. Die Substanz wurde in Konzentrationen von 50, 100 und 200 µg/ml zugegeben. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Ausplattieren der Waschlösung nach Inkubation. Bei Inkubation von Schweinedarmepithel mit dem *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314 konnte eine Zellzahl von  $1,8 \cdot 10^5$  Zellen/ml Waschlösung festgestellt werden. Die Kontrollsubstanz DMSO zeigte, bedingt durch die zytotoxische Wirkung des Lösungsmittels, eine um die Hälfte verringerte Zellzahl von  $9,5 \cdot 10^4$  Zellen/ml. Eine Inkubation von Blinddarmepithel mit der Substanz HKI-Nr. 9762047 führt demgegenüber zu einer fünffachen Reduktion der Zellzahl auf  $1,7 \cdot 10^4$  Zellen/ml bei verwendeten Endkonzentrationen von 50 und 100µg/ml. Bei Inkubation mit einer Substanzkonzentration von 200µg/ml ist eine höhere, verglichen mit dem Wildtyp- und Kontrollansatz dennoch niedrigere Zellzahl von  $4,4 \cdot 10^4$  Zellen/ml festgestellt worden (Abbildung 42). Die Substanz HKI-Nr. 9762047 hat somit einen negativen Effekt auf das Zellwachstum von *C. albicans* unter Gewebekulturbedingungen.



**Abbildung 42. Substanztest auf Schweinedarmepithel**

Die Substanz HKI-Nr. 9762047 wurde in verschiedenen Konzentrationen mit dem *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314 auf Schweineblinddarmepithel inkubiert und anschließend die Zellzahl in der Waschlösung bestimmt.

## 4. Diskussion

## 4. Diskussion

### 4.1 Das *Candida albicans* *SFL1*-Gen ist ein Homolog des *ScSFL1*

In dem Organismus *C. albicans* konnte ein homologes Gen zu dem in *S. cerevisiae* bekannten und beschriebenen Gen *SFL1* identifiziert werden. Es ist als orf19.454 annotiert, der aus 2418bp besteht. Die DNA-Sequenzidentität zum *S. cerevisiae* *SFL1* konnte mit 23% nachgewiesen werden. Das *ScSfl1* besitzt eine Hitzeschockfaktor-ähnliche DNA-Bindedomäne an Aminosäureposition 53 bis 384 (Fujita *et al.*, 1989). Das *C. albicans* *Sfl1* besitzt ebenfalls eine N-terminale DNA-Bindedomäne an Aminosäureposition 116 bis 204, die hohe Ähnlichkeit mit einer Hitze-Schock-Faktor ähnlichen DNA-Bindedomäne aufweist. Diese ist sowohl in *S. cerevisiae*, als auch in anderen verwandten Arten konserviert und scheint die Funktion der Bindung des Proteins an spezifische DNA-Abschnitte zu realisieren. Das *C. albicans* *Sfl1* besitzt, verglichen mit Proteinsequenzen verwandter Arten, einen elongierten N-Terminus des Proteins, wie auch der zu *SFL1* homologe ORF XP\_001481550 aus *Aspergillus fumigatus*. Dieser Pilz ist, wie auch *C. albicans*, ein opportunistisch humanpathogener Pilz und es ist bei diesem Organismus ebenfalls kein sexuelles Vermehrungsstadium bekannt (Brakhage, 2005; Pfaller und Diekema, 2004; Marr *et al.*, 2002).

### 4.2 *Sfl1* reprimiert die Flockulierung und Hyphenbildung

Eine *SFL1*-Deletion in *S. cerevisiae* führt zu Flockulierung, dem Absetzen von Zellen infolge starker Zell-Zelladhäsion, und zu pseudohyphalem, invasivem Wachstum. Das Gen *ScSFL1* ist verantwortlich für die Repression der Genexpression von flockulierungs-spezifischen Genen, wie *FLO11* (Robertson und Fink, 1998). Diese kodieren für GPI-verankerte Zelloberflächenglykoproteine, sog. Flocculine, die für die Ausbildung von Pseudohyphen, für invasives Wachstum, Flockulierung und Biofilmbildung nötig sind (Guo *et al.*, 2000; Lo und Dranginis, 1998; Lambrechts *et al.*, 1996).

Eine Gendeletion von *SFL1* in *C. albicans* konnte mittels genspezifischer Disruption und dem Ersetzen durch ein Markergen in dem auxotrophen Stamm SN148 erzeugt werden. Diese *sfl1*-Deletionsmutante, CAJ071 *sfl1::CmLEU2/sfl1::URA3*, zeigt eine verstärkte Aggregation von Zellen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm SC5314 in Vollmedium. Dieser Effekt ist in Minimalmedium verstärkt, so dass es zur Flockulierung innerhalb der Kultur kommt. Des Weiteren ist die Ausbildung von Hyphenzellen in diesen

Zellaggregaten unter nicht hypheninduzierenden Bedingungen zu beobachten. Dieser Deletionsphänotyp konnte durch Regulation der Genexpression mittels *CaMET3*-Promotor ebenfalls beschrieben werden, indem eine Genrepression durch Methioninzugabe zum Medium zur Ausbildung von Hyphenzellen und Flocken führt. Eine Überexpression von *SFL1* durch den *MET3*-Promotor führte unter hypheninduzierenden Bedingungen zu einer Repression der Hyphenbildung. Es konnten in Methioninmangelmedium bei 37°C mit 0,5g/l N-Acetylglucosamin keine Hyphenzellen beobachtet werden. Dagegen ist die Ausbildung von Hyphenzellen unter mikroaerophilen Bedingungen bei 25°C bei der *sfl1*-Deletionsmutante verstärkt gegenüber der des *C. albicans* Wildtyp-Stammes. Dieser Deletionsphänotyp lässt auf die Funktion des *CaSFL1* als Inhibitor der Zellaggregation und der Hyphenzellbildung schließen. Somit ist der Phänotyp des *C. albicans*-Deletionsstammes ähnlich dem der *S. cerevisiae* *sfl1*-Deletionsmutante, was auf eine analoge Funktion der Sfl1-Proteine als Transkriptionsfaktoren hindeutet.

#### 4.3 *CaSfl1* ist ein Transkriptionsrepressor

Die N-terminale Region des *S. cerevisiae* Sfl1 enthält eine DNA-Bindedomäne, ähnlich derer von Hitzeschockfaktoren (Fujita *et al.*, 1989). Das ScSfl1 ist ein Transkriptionsrepressor, der an spezifische Sequenzen im Promotorbereich von *FLO11* und *SUC2* bindet (Song und Carlson, 1998; Robertsson und Fink, 1998). In *S. cerevisiae* ist eine DNA-Konsensussequenz für die Bindung von Sfl1 mit der Anordnung AGAA-(n)-TTCT beschrieben worden (Shen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004; Conlan und Tzamarias, 2001).

In *C. albicans* konnte zunächst eine Lokalisierung des Sfl1 im Nukleus über eine GFP-Fusion verifiziert werden. Der ORF des *CaSFL1* wurde mittels PCR-basierter Markerkassetten am 3'-Ende mit dem ORF für das Grün-Fluoresziernde-Protein (GFP) fusioniert. Die Visualisierung des GFP-Signals erfolgte nach DAPI-Färbung des Nukleus über Fluoreszenz-Mikroskopie, die eine Überlagerung der Signale innerhalb des Zellkerns zeigte. Die Lokalisierung von Sfl1 im Nukleus deutet auf die Funktion von Sfl1 als Transkriptionsfaktor hin, da diese Proteine im Kern fungieren und lokalisiert sind.

Durch die Regulation der Genexpression von *SFL1* durch Fusion mit dem *MET3*-Promotor von *C. albicans* konnte eine Repression der Hyphenbildung gezeigt werden. Der Stamm war nach Vorinkubation in Methionin-Mangelmedium nicht in der Lage, Hyphenzellen unter hypheninduzierenden Bedingungen auszubilden. Dieser Phänotyp, der nach



Überexpression von *SFLI* entstand, deutet auf die Funktion von Sfl1 als ein Repressor der Hyphenbildung.

Des Weiteren konnte ein Ein-Hybrid-Assay mit dem *SFLI*-ORF, der mit dem ORF *lexA* aus *Staphylococcus aureus* fusioniert wurde, und dem *Streptococcus thermophilus lacZ* als Reportergen durchgeführt werden. LexA ist ein Repressor, der durch Bindung an die palindromische Sequenz im *lexA*-Operator als Dimer die Transkription von Genen des SOS-Regulons, das der DNA-Reparatur und Zellteilung dient, inhibiert. Die Expressionsrate des *SFLI* wurde mit der von *GCN4*, einem Transkriptionsaktivator, und *NRG1*, einem Transkriptionsrepressor, verglichen. Gcn4 ist ein Transkriptionsaktivator von Aminosäuresynthesegenen, der unter Aminosäuremangelbedingungen metabolische und morphogenetische Regulationen ausübt (Tripathi *et al.*, 2002). Nrg1 ist ein Transkriptionsrepressor hyphenspezifischer Gene, von Virulenzgenen und der Chlamydo-sporenentwicklung, sowie von Stressantwort assoziierten Genen (Kadosh und Johnson, 2005; Staib und Morschhäuser, 2005; Murad *et al.*, 2001). Das Ergebnis des Assays zeigte eine schwache Expressionsrate des Reportergens *lacZ* bei Integration des *SFLI* fusionierten *lexA*. Eine *GCN4*-Fusion zeigte eine hohe Expressionsrate, während eine *NRG1*-Fusion zu einer niedrigen Reportergenexpression führte. Die Werte des Assays für die Expressionsrate der *SFLI*-Fusion liegen zwar über denen für den Transkriptionsrepressor *NRG1*, allerdings deutlich unter denen des Transkriptionsaktivators *GCN4*. Dies lässt eine schwach reprimierende Wirkung des Sfl1 vermuten. Eine Transkriptionsaktivierung durch Sfl1 kann durch den Vergleich mit dem Transkriptionsaktivator *GCN4* ausgeschlossen werden. Hiermit wurde gezeigt, dass Sfl1 nicht als Transkriptionsaktivator fungiert.

#### 4.4 Regulation von *SFLI*

*S. cerevisiae* besitzt drei Proteinkinasen A, Tpk1, Tpk2 und Tpk3, von denen Tpk2 spezifisch mit Sfl1 interagiert und dieses negativ reguliert. Das Flocculin *FLO11* wird transkriptionell durch Tpk2 und Sfl1 reguliert, wobei Tpk2 in der Regulation oberhalb von Sfl1 fungiert. Phosphorylierung durch die Proteinkinase A führt zu Sfl1-vermittelter Repression durch die Aufhebung der Dimerisierung und damit verbundenen Inhibierung der DNA-Bindung von Sfl1 (Pan und Heitmann, 2002). Ebenso verstärkt eine Deletion von *TPK2* den Anteil von an spezifischen Promotorelementen gebundenem Sfl1. Das Protein Sfl1 besitzt fünf Proteinkinase A Phosphorylierungsstellen mit der Konsensussequenz R/K

R/K X S/T (Robertson und Fink, 1998). Die Genexpression von *FLO11* ist abhängig von Flo8, das über den cAMP-Signalweg fungiert (Rupp *et al.*, 1999). Des Weiteren wird die Expression von *FLO11* durch Ste12 über den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg reguliert (Lo und Dranginis, 1998). In *S. cerevisiae* wird *SFL1* durch die Proteinkinase Tpk2 des cAMP-Signaltransduktionsweg reguliert. Die Aufhebung der Genrepression wird über die Phosphorylierung durch die Proteinkinase Tpk2 realisiert, so dass eine Dimerisierung des Proteins erfolgt und eine Bindung an den Promotor von *FLO11* aufgehoben wird (Robertson und Fink, 1998; Pan und Heitmann, 2002).

In *C. albicans* existieren zwei Proteinkinasen A, Tpk1 und Tpk2 (Sonneborn *et al.*, 2000; Bockmühl *et al.*, 2001; Cloutier *et al.*, 2003). Deletionsmutanten von *tpk1* besitzen einen Hyphendefekt auf hypheninduzierendem Festmedium, während die Hyphenzellbildung in Flüssigmedium nur schwach beeinflusst ist. Dagegen zeigt eine *tpk2*-Deletionsmutante einen Hyphendefekt in hypheninduzierendem Flüssigmedium und kaum morphologische Veränderungen bei Inkubation auf Festmedium. Ebenso weist eine *tpk2*-Deletionsmutante reduzierte Virulenz auf. Eine Überexpression von *TPK2* induziert die Hyphenbildung und invasives Wachstum der Zellen auf Agar-Medium (Sonneborn *et al.*, 2000; Bockmühl *et al.*, 2001). Eine Funktion der *CaTpk2* als Proteinkinase konnte durch Phosphorylierung eines Peptides nachgewiesen werden (Sonneborn *et al.*, 2000).

Eine analoge Phosphorylierung von Sfl1 durch Tpk2 ist wahrscheinlich, so dass der cAMP-Signaltransduktionsweg, der in *C. albicans* ebenfalls zu Hyphenbildung und Zelladhäsion führt, ebenfalls über die Regulation von Sfl1 fungiert.

#### 4.5 Sfl1 reguliert hyphenspezifische Gene

Das *S. cerevisiae* Sfl1 interagiert mit Ssn6, einer Komponente des Co-Repressors Ssn6-Tup1, der die Transkription verschieden regulierter Gene inhibiert. Sfl1 ist an Promotoren verschiedener, durch Ssn6-Tup1 reprimierte Gene vorhanden. Die Transkriptionsinhibierung erfolgt über Rekrutierung des Ssn6-Tup1-Komplexes durch Bindung an eine spezifische Domäne in Sfl1 (Conlan und Tzamarias, 2001). In *S. cerevisiae* werden verschiedene Gene, wie *FLO11* und *SUC2*, durch Sfl1 reprimiert (Robertson und Fink, 1998; Song und Carlson, 1998; Pan und Heitmann, 2002). Der Repressor Sfl1 und der Aktivator Flo8 kontrollieren die Expression von *FLO11*, indem sie antagonistisch an ein gemeinsames Promotorelement binden. Sfl1 und Flo8 sind direkte molekulare Ziele der

katalytischen PKA-Untereinheit Tpk2. Eine Phosphorylierung durch Tpk2 vermittelt die Bindung von Flo8 und Aktivierung von *FLO11* und verhindert die Repression von Sfl1 durch Aufhebung der Dimerisierung und DNA-Bindung (Pan und Heitmann, 2002). Der haploide *S. cerevisiae*-Stamm  $\Sigma$ 1278b des Laborstammes S288c zeigt keine Expression von *FLO1* und *FLO11*. Der Phänotyp dieses Stammes und der einer *FLO11*-Deletionsmutante lassen auf eine Funktion von *FLO11* für die Ausbildung von Pseudohyphen schließen (Fichtner *et al.*, 2007; Gimeno und Fink, 1992; Mösch und Fink, 1997). Der Stamm S288c ist defekt für Pseudohyphenwachstum, Biofilmbildung und Adhäsion. Dieser trägt eine Mutation im *FLO8*-Gen, einem Transkriptionsaktivator weiterer *FLO*-Gene (Liu *et al.*, 1996). Die Zellformen Hefezelle, Pseudohyphe und Hyphenzelle in *C. albicans* werden teilweise von *FLO8* reguliert (Lopez-Ribot, 2005; Nobile und Mitchell, 2005; Ramage *et al.*, 2005). Der Transkriptionsaktivator CaFlo8 ist essentiell für das Hyphenwachstum, die Expression hyphenspezifischer Gene und die Virulenz. Flo8 interagiert mit Efg1 und reguliert so hyphenspezifische Gene und Virulenz-assoziierte Gene (Cao *et al.*, 2006)

Das *C. albicans* Ssn6, das Homolog zu ScSsn6, reguliert das filamentöse Wachstum und die Virulenz in diesem Organismus. Hyphenspezifische Gene werden bei 37°C durch Ssn6 reprimiert und die Expressionsrate von *SSN6* sinkt bei Hypheninduktion mit Serum. Ssn6 fungiert unterhalb von Tup1, Cph1 oder Efg1, da eine Überexpression dieser Gene den Phänotyp der *ssn6*-Deletionsmutante nicht wieder herstellen konnte (Hwang *et al.*, 2003). Sowohl Ssn6, als auch Tup1 werden zu Nrg1-vermittelten Repression von NRE-Promotoren benötigt (García-Sánchez *et al.*, 2005). Bei der Ausbildung von Hyphenzellen in *C. albicans* werden 61 Gene signifikant induziert. Circa die Hälfte dieser Gene wird durch die Transkriptionsfaktoren Tup1, Nrg1, Rfg1 reprimiert. (Kadosh und Johnson, 2005). Tup1 ist ein Transkriptionsrepressor, der hyphenspezifische Gene, wie *HWPI*, reprimiert (Braun *et al.*, 2000). Nrg1 reprimiert hyphenspezifische Gene, wie *ECE1* und *HWPI*, unter nicht hypheninduzierenden Bedingungen (Braun *et al.*, 2001). Rfg1 ist ein transkriptioneller Regulator, der das filamentöse Wachstum von *C. albicans* in Abhängigkeit vom Nährstoffgehalt steuert (Kadosh und Johnson, 2001). *HWPI* kodiert für ein hyphenspezifisches, Glykosylphosphatidyl-gebundenes Zellwandprotein. Dieses Gen wird in Hyphenzellen stark exprimiert und ist in Hefezellen kaum detektierbar. Hwp1 dient als Transglutaminasesubstrat und ermöglicht eine kovalente Bindung an Epithelzellen (Staab *et al.*, 2004; Staab *et al.*, 1996). HWP1 fungiert unterhalb der Entwicklungs-

regulatoren Efg1, Tup1 und Rbf1 (Sharkey *et al.*, 1999). *ECE1* ist ebenfalls ein hyphen-spezifisches Gen, das bei Hyphenbildung induziert wird (Nantel *et al.*, 2002; Birse *et al.*, 1993). Die hyphenspezifischen Gene *ALS1* und *ALS3* gehören zur *ALS*-Genfamilie (Agglutinin like sequences), die aus den acht Genen *ALS1* bis *ALS7* und *ALS9* besteht, die für Zelloberflächenglykoproteine, sog. Adhäesine, kodieren (siehe 4.6). Die Expression von *ALS1* ist in Hyphenzellen verstärkt, aber nicht exprimiert in exponentieller Hefezellwachstumsphase (Hoyer *et al.*, 1995; Fu *et al.*, 2002). Als1 lokalisiert an der Zelloberfläche der Verbindungsstelle zwischen Filament und Blastospore und ist essentiell für die Filamentierung in *C. albicans* (Fu *et al.*, 2002). *ALS3* besitzt zwei unterschiedlich lange Allele, die jeweils für ein Adhäsin kodieren (Oh *et al.*, 2005).

Ebenso interagiert ScSfl1 mit Ssn2, Ssn8, Sin4 und Rox3, was eine Interaktion von Sfl1 mit den Srb/Mediator-Proteinen für eine Transkriptionshemmung mittels des RNA Polymerase II Holoenzym ermöglicht (Song und Carlson, 1998). Sin4 und Ssn3, Komponenten spezifischer RNA PolymeraseII-Subkomplexe, die für die Expression von Ssn6-Tup1-Repressoraktivität benötigt werden, sind ebenso für die reprimierende Funktion von Sfl1 nötig. Dies lässt auf eine reprimierende Funktion von ScSfl1 mittels Ssn6-Tup1 und spezifischer Untereinheiten des PolymeraseII Holoenzym schließen (Conlan und Tzamarias, 2001). Der Co-Repressor Tup1 fungiert in Zusammenhang mit Sfl1 und reguliert den Nrg1-Repressor (Berkey *et al.*, 2004).

In *C. albicans* konnte durch RT-PCR gezeigt werden, dass die Genexpression der hyphenspezifischen Gene *ALS1*, *ALS3*, *HWP1* und *ECE1* durch die *sfl1*-Deletion induziert wird. Die Expression dieser Gene ist in Wildtyp-Zellen SC5314 unter nicht hypheninduzierenden Bedingungen reprimiert, allerdings konnte mRNA dieser Gene bei der *sfl1*-Deletionsmutante in SD-Minimalmedium bei 30°C nachgewiesen werden. Somit fungiert das *C. albicans* Sfl1p als Repressor hyphenspezifischer Gene. Es kann eine analoge Funktionsweise von Sfl1 zu dem homologen Sfl1 aus *S. cerevisiae* angenommen werden, in der Form dass eine Repression über eine Promotorbindung des Proteins in Interaktion mit dem Ssn6-Tup1-Komplex erfolgt. Die Regulation der Genexpression hyphenspezifischer Gene durch den generellen Repressor Tup1 kann in *C. albicans* durch die Bindung von Sfl1 an Tup1 oder an weitere Co-Repressoren erfolgen. So wäre eine Expressionshemmung hyphenspezifischer Gene durch die Bindung von Sfl1 an spezifische Promotoren möglich.

#### 4.6 Zell-Zell-Adhäsion und Hyphenbildung in *Candida albicans*

Adhäsion wird durch Zelloberflächenproteine, sog. Adhäsine oder Flocculine, realisiert, die spezifische Aminosäuren oder Zuckerreste auf Zelloberflächen binden oder die Bindung an abiotische Oberflächen vermitteln. Alle Pilzadhäsine besitzen eine 3-Domänenstruktur, die aus einem C-terminalen, einem mittleren und einem N-terminalen Bereich besteht. Die C-terminale Domäne ist durch eine serin- und threoninreiche Sequenz gekennzeichnet und besitzt eine Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Verankerung in der Zellwand (Bony *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999). Die mittlere Domäne ist durch verschiedene, zahlreiche Wiederholungen von 108bp charakterisiert. Diese 108bp-Abschnitte besitzen eine konservierte DNA-Sequenz, die als Quelle für Variabilität dient, indem häufige Rekombinationen ausgelöst werden. Der N-Terminus eines Adhäsins ragt aus der Zelloberfläche heraus und trägt eine Kohlenhydrat- oder Peptidbindedomäne (Kobayashi *et al.*, 1999; Groes *et al.*, 2002; Rigden *et al.*, 2004).

In *Saccharomyces cerevisiae* werden diese Adhäsine durch *FLO*-Gene kodiert. *S. cerevisiae* besitzt sechs *FLO*-Gene: *FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10* und *FLO11*. Die Gene *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10* führen zu Zell-Zell-Adhäsion (Teunissen und Steensma, 1995), während *FLO11* die Adhäsion zu Oberflächen vermittelt (Fichtner *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2000). *FLO11* (*MUC1*) kodiert für ein Glykosylphosphatidyl-verankertes Glykoprotein, ähnlich den Adhäsinen pathogener Pilze (Lo und Dranginis, 1996). *Flo8* dient als Transkriptionsaktivator von *FLO11* (Pan und Heitmann, 2002).

*C. albicans* Adhäsine werden durch die *ALS*-Genfamilie (*ALS1* bis *ALS7* und *ALS9*), sowie *HWP1* und *EAP1* kodiert und vermitteln Adhäsion an organische und anorganische Oberflächen, an extrazelluläre Matrixproteine und an Endothel- und Epithelzellen (Fu *et al.*, 2002; Gaur und Klotz, 1997; Li und Palecek, 2003; Staab *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2005). Des Weiteren besitzt *C. albicans* ein zu *S. cerevisiae FLO11 (MUC1)* indentisches Gen.

Adhäsine der *ALS*-Genfamilie vermitteln ebenso die Adhäsion gemischter mikrobieller Aggregate mit anderen Pilzen und Bakterien in Biofilmen und auf Schleimhäuten (Klotz *et al.*, 2007). Die *ALS*-Gene untereinander besitzen eine hohe Sequenzidentität und eine hohe allelische Varianz. Alle *ALS*-Gene zeigen eine Anordnung in konservierter 5'Domäne, einer serin- und threoninreichen, zentralen Domäne mit aufeinander folgenden Sequenz-

wiederholungen und eine 3'Domäne mit hoher variabler Länge und Sequenz (Hoyer *et al.*, 2007; Hoyer *et al.*, 2001). Des Weiteren besitzen Als Proteine eine N-terminale sekretorische Signalsequenz und eine GPI-Anker Zusatzsequenz am C-Terminus, so dass dies eine Lokalisierung der Adhäsine an der Zellwandoberfläche erklärt (Hoyer *et al.*, 1998; Hoyer *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2007b). Diese Adhäsine vermitteln die Adhäsion an Endothel- und Epithelzellen und sind daher vorrangig in Wirt-Pathogen-Interaktionen involviert. (Zhao *et al.*, 2007b). Die Gene *ALS1* bis *ALS4* und *ALS9* tragen zur Adhäsion von *C. albicans* bei (Fu *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004, 2005, 2007a, 2007b). Eine *ALS7* Expression in *S. cerevisiae* zeigte keine adhärierenden Fähigkeiten (Sheppard *et al.*, 2004). Das *C. albicans ALS1* vermittelt die Bindung an Epithelzellen (Fu *et al.*, 1998). *ALS1* ist in Reaktion auf Medienveränderung reguliert und besitzt Ähnlichkeit zum *S. cerevisiae SAG1*, einem  $\alpha$ -Agglutinin, welches die Paarung haploider Zellen vermittelt (Hoyer *et al.*, 1995). Als1 ist ein Effektor der Filamentierung in *C. albicans*, dessen Expression durch den Transkriptionsfaktor Efg1 kontrolliert wird. Das Protein besitzt strukturelle und funktionelle Homologie zum *FLO11* von *S. cerevisiae* (Fu *et al.*, 2002). Bei der Hypheninduktion wird *ALS1* vor *ALS3* transkribiert. Deletionsmutanten beider Gene zeigen ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten. So ist eine *als3*-Deletionsmutante nicht in der Lage, an Epithelzellen zu adhären, aber an Fibronektin-beschichtete Kunststoffoberflächen konnte eine Adhäsion nachgewiesen werden. Eine *als1*-Deletionsmutante hingegen zeigte verringerte Adhäsion an Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC), aber bezüglich der Adhäsion an Mundepithelzellen und Fibronektin war kein Defekt zu beobachten (Zhao *et al.*, 2004). Expressionsstudien zeigten, dass einige *ALS*-Gene, wie *ALS6* und *ALS7*, konstitutiv niedrig exprimiert werden, während andere, wie *ALS1*, *ALS2* und *ALS3*, transkriptionell reguliert werden (Green *et al.*, 2005a; Green *et al.*, 2005b).

Eine Sequenzanalyse in dem stromaufwärts gelegen Genbereich der *ALS*-Gene zeigte mehrere Sequenzmotive für DNA-Bindestellen in *ALS1* und *ALS3*. Bei *ALS1* konnten sechs und bei *ALS3* drei dieser Bindemotive gefunden werden, was eine stärkere Genrepression von *ALS1* im Vergleich einer Genrepression von *ALS3* durch DNA-Bindeproteine, wie beispielsweise Sfl1, vermuten lässt. Die Zelladhäsion von Stämmen mit einer Überexpression von *ALS1* und *ALS3* wurde untersucht und verglichen. Dabei konnte die *ALS3*-vermittelte Zelladhäsion durch eine *ALS3*-Überexpression in *C. albicans* nachgewiesen. Eine *AgTEF1*-Promotor getriebene Expression von *ALS3* führt zu

adhärierenden Zellen. Damit wurde die durch Sfl1 regulierte Zell-Zelladhäsion mittels Als3 nachgewiesen.

Für die Aufklärung der Bindung des Transkriptionsrepressors Sfl1 in *C. albicans* an spezifische Promotorelemente sind Nachweise mittels direkter Bindestudien notwendig. Hierbei könnte eine Protein-DNA-Interaktion mit Hilfe eines Chromatin-Immunopräzipitation-Experiments (ChIP on CHIP) untersucht werden. Darüber hinaus kann das Netzwerk dieser Regulationsmechanismen besser verstanden werden. Die Regulation der Genexpression, die in Zusammenhang mit der Hyphenbildung steht, kann durch Aufschlüsselung der Mechanismen in *C. albicans* und dem Vergleich mit konstitutiv filamentösen Pilzen zum Verständnis für die Änderung der Morphologie des Pilzes beitragen. Genaue Kenntnisse dieser Regulation ermöglichen die gezielte Beeinflussung der Hyphenbildung und damit die Grundlage für eine Modifizierung durch externe Stimuli, wie spezifische Medikation.

#### 4.7 Die *TLO*-Genfamilie

Das Gen *CTA2* aus *C. albicans* wurde in einem Ein-Hybrid-Experiment in *S. cerevisiae* als Transkriptionsaktivator beschrieben (Kaiser *et al.*, 1999). Dieses Gen besitzt mehrere sequenzähnliche Kopien im Genom, die telomernah lokalisiert sind (Goodwin und Poulter, 2000). Die Suche nach *CTA2*-Sequenzen im Genom resultierte in 17 verschiedenen *CTA2*-Genen, die zu einer Genfamilie zusammengefasst werden. Eine Überarbeitung der Genomsequenz von *C. albicans* ergab eine 14 Gene umfassende Genfamilie, die aufgrund ihrer telomernahen Lokalisierung mit *TLO* (Telomere associated) bezeichnet werden (van het Hoog *et al.*, 2007). Dabei wurden die zuvor annotierten *CTA2* orf19.2295 und orf19.3386 in der Assemblierung 20 deletiert. Der orf19.631 wurde der Gensequenz des *TLO34* zugeordnet. Das Gen *TLO14* wurde mittels PCR nachgewiesen, ist allerdings noch nicht sequenziert und als ORF annotiert (van het Hoog *et al.*, 2007). Die *TLO*-Gene besitzen eine hohe Sequenzähnlichkeit von bis zu 99% untereinander und gruppieren aufgrund von Sequenzunterschieden im 5' und 3'-Bereich in zwei Gruppierungen. *TLO34* ist auf Chromosom 1 nicht telomernah lokalisiert und besitzt den längsten offenen Leserahmen (ORF). Die 5'-terminale Sequenz dieses ORF weist auf eine vollständige, im Gegensatz zu den anderen *TLO*-Sequenzen nicht unterbrochene Sequenz hin, so dass eine funktionelle Information aller *TLO*-Gene von *TLO34* ausgehen könnte.

Die Einteilung der *TLO*-Gene in zwei Gruppierungen beruht auf deren Sequenzidentitäten im 5'- und 3'-Bereich. Die *TLO*-Gruppe ohne zusätzlichen C-Terminus wurde allerdings mittels RT-PCR mit zwei verschiedenen Transkripten nachgewiesen, obwohl die Gensequenzen keinen Hinweis auf ein Intron und somit die Möglichkeit zur posttranskriptionellen Modifikation geben (van het Hoog *et al.*, 2007).

Die Expressionsrate verschiedener *TLO*-Gene wurde sowohl in Hefe- als auch in Hyphenzellen bestimmt, wobei eine zweifach höhere Expressionsrate dieser Gene in Hyphenzellen vorliegt (Sickinger und Wendland, unveröffentlicht). Aufgrund der Lokalisierung der *TLO*-Gene am Telomer wurde eine Regulation dieser Gene durch Genstilllegung am Telomer (telomeric silencing) vermutet. Dieses Prinzip der Genregulation ist beispielsweise bei Paarungs-assoziierten Genen, wie MTL-Loci (Mating-type-like), bei *S. cerevisiae* beschrieben. *S. cerevisiae* besitzt zwei unexprimierte Kopien der MAT loci *HML* und *HMR* die durch die Histondeacetylase Sir2 und den assoziierten Proteinen Sir1, Sir3 und Sir4 stillgelegt werden (Gottschling *et al.*, 1990). Sir2 ermöglicht die transkriptionelle Genstilllegung der MAT-Loci *HML* und *HMR*, am Telomer und am rDNA Lokus *RDNI* (Blander und Guarente, 2004). Die vier Proteine Sir1, Sir2, Sir3 und Sir4 reprimieren die Genexpression der *HML*- und *HMR*-Loci durch Genstilllegung (Rine und Herskovitz, 1987). Ebenso existiert eine Genstilllegung am Telomer (Gottschling *et al.*, 1990). Sir2, aber nicht Sir3 und Sir4, ist nötig für die rDNA Genstilllegung des Gens *RDNI* (Bryk *et al.*, 1997; Smith und Boeke, 1997). Diese epigenetische Genstilllegung wird durch eine geschlossene, unerreichbare Chromatinstruktur verursacht, die durch Deacetylierung von Lysin-Resten an Histon H3 und H4 erreicht wird (Loo und Rine, 1994; Bi und Broach, 1997). Die Genstilllegung am Telomer betrifft Gene, die weniger als 20kbp vom Telomerende entfernt sind. Die Stilllegungseffizienz ist abhängig vom Abstand der Gene zum Telomerende (Gottschling *et al.*, 1990). Die *TLO*-Gene sind weniger als 20 kbp vom jeweiligen Telomerende entfernt. Eine mögliche Genregulation dieser *TLO*-Gene durch Genstilllegung mittels Histondeacetylasen wurde zunächst angenommen. Ein Versuch zum Nachweis des Telomeric silencing durch *TLO*-Promotor-*URA3*-Fusionsmutanten gab einen Hinweis auf eine derartige Regulation (Martin, 2007). Das *TLO34* ist nicht telomernah lokalisiert, so dass eine positionsbedingte Genstilllegung hier nicht angenommen werden kann.



In *C. albicans* existiert ein Sir2-Homolog mit Sequenz- und Funktionsähnlichkeit zum *S. cerevisiae* Sir2. Eine Gendeletion führt zur Ausbildung verschiedener Kolonieförmigkeiten mit einer hohen Frequenz. Eine Inaktivierung von *SIR2* führt zu einer Stimulierung filamentösen Wachstums in Vollmedium. Der Transkriptionsrepressor *TUP1* reprimiert das filamentöse Wachstum und fungiert unterhalb von *SIR2* (Perez-Martin *et al.*, 1999). Die Expressionsrate der *TLO*-Gene ist in Hyphenzellen zweifach erhöht, so dass eine epigenetische Regulation durch Sir2, die das filamentöse Wachstum inhibiert, zu vermuten war.

Bei der Selektion der *TLO*-Promotor-*URA3*-Fusionsmutanten wurde eine Mutationsrate von 1,7 bzw.  $3,5 \cdot 10^{-4}$  Zellen/ml festgestellt. Für *S. cerevisiae* wurde eine phänotypische Mutationsrate von  $5,43 \cdot 10^{-8}$  Zellen/Generation für die Selektion auf 5-FOA beschrieben. *C. albicans* besitzt eine Mutationsrate für 5-FOA von 2,79 und  $4,15 \cdot 10^{-7}$  Zellen/Generation (Lang und Murray, 2008; Ueno *et al.*, 2007). Die für die *TLO*-Gene festgestellte Mutationsrate ist damit höher als bei einer vergleichbaren Selektion mittels 5-FOA, so dass eine zusätzliche epigenetische Genregulation durch Genstilllegung angenommen wurde. Eine Umkehrung der Genstilllegung durch Histondeacetylasen sollte demnach für einen Anteil von ca.  $1 \cdot 10^4$  Zellen möglich sein, allerdings zeigten die Versuche zur Wiederherstellung des *URA3*<sup>+</sup>-Status keine Hinweise auf eine epigenetische Genstilllegung. Die Untersuchungen zur Wiederherstellung des *URA3*-Status durch Selektion auf Uridin-Selektivmedium ergaben keinen *URA3*<sup>+</sup>-Stamm. Die erhöhte Anzahl an *ura3*<sup>-</sup>-Zellen nach Selektion mit 5-FOA könnte durch Chromosomenumlagerungen verursacht sein. Eine lange Exposition von Zellen mit 5-FOA führt zu einer Duplikation des Chromosoms 4b oder zu einer Verlängerung innerhalb des Chromosoms 5b. Dies geschieht mit einer Frequenz von  $1 \cdot 10^{-5}$ . Eine kurzzeitige Exposition mit 5-FOA induziert unspezifische Veränderungen der Länge verschiedener Chromosomen (Wellington und Rustchenko, 2005). Zudem besitzt *C. albicans* Hauptwiederholungssequenzen (Major repeat sequences, MRS), die vollständig oder teilweise auf jedem der acht Chromosomen vorhanden sind (Chindamporn *et al.*, 1998; Iwaguchi *et al.*, 1992; Chibana *et al.*, 1994; Chindamporn *et al.*, 1995). Chromosomentranslokationen treten sehr häufig an oder in der Nähe dieser Hauptwiederholungssequenzen auf (Iwaguchi *et al.*, 2004). Des Weiteren sind subtelomere Wiederholungssequenzen, so genannte CARE-2, an jedem Chromosomenende vorhanden (Lasker *et al.*, 1992; Thrash-Bingham und Gorman, 1993). Jedes telomernahe *TLO*-Gen ist in der 5'-Region von einer CARE-2-Sequenz mit einer  $\kappa$ -Sequenz flankiert

(van het Hoog *et al.*, 2007). Diese Wiederholungssequenzen nahe der *TLO*-Gene sind Orte hoher Rekombinationsfrequenz, so dass die erhöhte Mutationsrate der erhaltenen *TLO*-Promotor-fusionierten *URA3*<sup>+</sup>-Stämme aus einer erhöhten Rekombinationsfrequenz resultiert.

Damit wurde gezeigt, dass die *TLO*-Gene nicht durch die positionsbedingte Genstilllegung reguliert werden. Die abweichende Rate an selektierten Zellen bei den untersuchten Fusionsstämmen kann durch Chromosomenumlagerungen und den Verlust von Chromosomen erklärt werden.

Die Regulation der Genexpression und die Funktion der *TLO*-Gene kann durch Expressions- und Bindestudien, Lokalisierungen und vergleichende Analysen identifiziert werden. Das Vorkommen von *TLO*-Genen in anderen Pilzarten ermöglicht einen Vergleich der Funktionen dieser Gene mit denen der *TLO*-Genfamilie in *C. albicans*. Die genetische Variabilität des Pilzes und die telomernahe Lokalisierung der *TLO*-Gene sind auf ihren Zusammenhang mit der Virulenz des Pilzes hin zu überprüfen.

### 4.8 Resistenzmechanismen gegenüber Antimykotika

Bisher werden Antimykotika mit Wirkung auf den Zellmembranbaustein Ergosterol oder dessen Biosynthese, sowie als Nukleinsäuresynthese- und Mitosehemmer verwendet. Resistenzen gegenüber einzelnen Substanzen haben sich ausgebildet, die sich vor allem in der Veränderung der Ergosterolbiosynthese widerspiegeln. Polyen-resistente *Candida*-Arten haben einen reduzierten Ergosterolgehalt in der Zellmembran, was zu verminderter Bindung des Antimykotikums führt. Eine Fluconazol-Resistenz entsteht in 10% der Fälle von Candidiasis im späten AIDS-Stadium, die durch eine defekte Sterol-5,6-Sättigung infolge einer defekten C-5-Desaturase, kodiert durch *EGR3*, hervorgerufen wird. Dies führt zu einer veränderten Sterolbiosynthese von 14 $\alpha$ -methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol zu 14 $\alpha$ -methylfecosterol. Diese, durch Ergosterolmangel hervorgerufene, Azol-Resistenz führt allerdings ebenfalls zur Resistenz gegenüber anderen Antimykotika, wie Amphotericin B (Kelly *et al.*, 1997; Nolte *et al.*, 1997).

Eine weitere Resistenz von *C. albicans* gegenüber Fluconazol entsteht durch Mutation im *ERG11*-Gen, das für die Sterol-14 $\alpha$ -Demethylase kodiert, wobei sich die Affinität des

Antimykotikums für das Enzym verringert (White *et al.*, 1998). Die verringerte Affinität ist auf eine durch Aminosäureaustausch beruhende strukturelle oder funktionelle Veränderung der CytochromP450-Gruppe des Enzyms zurückzuführen (Marichal *et al.*, 1999). Um eine effiziente fungizide Wirkung zu erzielen, muss die Sterol-14 $\alpha$ -Demethylase effektiv inhibiert werden. Eine Überexpression des *ERG11*-Gens kann daher zu Resistenz von *C. albicans* gegenüber Fluconazol führen (Kontoyiannis *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 2001).

Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die Überexpression von Membrantransportproteinen, wie die ATP-binding-cassette (ABC)-Transporter Cdr1p und Cdr2p und Mdr1p. Eine Überexpression dieser Gene wird allerdings durch Mutationen in bisher unbekannten Regulatoren verursacht (Wirsching *et al.*, 2000). Die Effluxpumpen Cdr1 und Cdr2 schleusen neben Fluconazol auch andere Azole aus der Zelle aus, so dass eine Kreuzresistenz gegen verschiedene Azol-Antimykotika entsteht, während Mdr1 nur Fluconazol als Azol-Antimykotikum transportiert. Resistenzen bei *C. albicans* gegenüber Echinokandinen sind selten, da Mutationen, die eine Resistenz gegen Azole verursachen, durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen nicht zu Echinocandin-Resistenz führen. Ebenso sind resistente Stämme, die Effluxpumpen überexprimieren sensitiv für Caspofungin. Daher wirken Echinocandine auch gegen Azol-resistente Stämme (Bachmann *et al.*, 2002). Eine bekannte Resistenz entsteht durch Mutation im *FSK1*-Gen, das für die katalytische Untereinheit der  $\beta$ -1,3-Glucansynthase kodiert (Douglas *et al.*, 1997). Die verschiedenen Resistenzmechanismen beruhen auf Mutationen in definierten Genen, wie beispielsweise *ERG3*, *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* und *FSK1*.

Der Wirkmechanismus der getesteten HKI-Substanzen könnte anhand dieser beschriebenen Mutationen durch Identifikation resistenter *S. cerevisiae*-Deletionsstämme beschrieben werden, so dass entweder das Zielenzym oder Membrantransportproteine identifiziert werden. Es konnten verschiedene Deletionsmutanten als resistent gegenüber den getesteten HKI-Substanzen identifiziert werden. Dazu gehören Gendeletionen für die Membranproteine Las21, einem integralen Plasmamembranprotein zur GPI-Synthese, und Atg2, einem peripheren Membranprotein für die Bildung zytosolischer, absondernder Vesikel.

Als sensibler *S. cerevisiae*-Stamm wurde für die HKI-Substanz Nr. 10126132 u. a. die *erg6*-Deletionsmutante identifiziert. Das Gen *ERG6* kodiert für die  $\Delta(24)$ -sterol-C-methyltransferase, ein Enzym, das Zymosterol zu Fecosterol methyliert. *C. albicans erg6*-Deletionsmutanten weisen eine Hypersensitivität gegenüber Sterolbiosynthese- und metabolischen Inhibitoren auf, wie beispielsweise Terbinafin, einem Inhibitor der Squalenepoxidase, auf. Eine erhöhte Sensitivität gegenüber Azolen tritt nicht auf (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998). Somit kann die Funktion der Substanz Nr. 10126132 auf die Inhibition der Sterolbiosynthese oder den Stoffwechsel der Zelle beschränkt werden. Des Weiteren wurde durch Analyse der sensiblen *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten ein Anteil von vakuolären Proteinen identifiziert, die an der Detoxifizierung und der Ausschleusung der Substanzen aus der Zelle beteiligt sind. Scheint beispielsweise die Acidifizierung der Vakuole durch Deletion von *VPH2*, *VMA5* und *VMA13* gestört, so sind diese Zellen sensibel für die getesteten Substanzen. Für die Substanz HKI- Nr. 10226069 wurde das Gen *KAP122* in einer sensiblen Deletionsmutante identifiziert, das für den Import des Toa1-Toa2 Komplexes in den Nukleus verantwortlich ist. Es bindet die Nukleoporine Nup1 und Nup2 und spielt eine Rolle in pleiotropischer Antimykotika-Resistenz (Chen *et al.*, 1991; Titov und Blobel, 1999). Eine Antimykotika-Exposition stellt Umweltstress für den pathogenen Pilz *C. albicans* dar und führt so zu einer Antimykotika-Toleranz und im weiteren Verlauf zu einer Resistenz (Cannon *et al.*, 2007).

Die Ausbildungen von Resistenzmechanismen erfordern den Einsatz eines breiten Spektrums an verschiedenen Wirkstoffen. Allerdings sind diese Ansätze oftmals mit erhöhten Nebeneffekten oder einer verminderten Wirksamkeit verbunden. Für die Entwicklung neuer Antimykotika sind spezifische molekulare Ansätze gefordert. Daher ist das Verständnis der genetischen und physiologischen Mechanismen in den pathogenen Pilzen unerlässlich. Spezifische Wirkstoffherstellung könnte durch Kenntnis geeigneter Zielstrukturen und der Mimetisierung von Stoffwechselvorgängen oder Molekülen einhergehen.

## 5. Literaturverzeichnis

## 5. Literaturverzeichnis

### 5.1 Fachliteratur

- Anderson, M. L. and Odds, F. C. (1985). Adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelia: significance of morphological form and effect of ketoconazole. *Mykosen* **28**, 531-40.
- Bachmann, S. P., Patterson, T. F. and Lopez-Ribot, J. L. (2002). In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol* **40**, 2228-30.
- Bahn, Y. S. and Muhlschlegel, F. A. (2006). CO<sub>2</sub> sensing in fungi and beyond. *Curr Opin Microbiol* **9**, 572-8.
- Bartel, P. L. and Fields, S. (1994). Yeast 2-Hybrid System, Oxford University Press, New York, **7**, 109-147.
- Bassilana, M., Hopkins, J. and Arkowitz, R. A. (2005). Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryot Cell* **4**, 588-603.
- Bennett, R. J. and Johnson, A. D. (2005). Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* **59**, 233-55.
- Berkey, C. D., Vyas, V. K. and Carlson, M. (2004). Nrg1 and nrg2 transcriptional repressors are differently regulated in response to carbon source. *Eukaryot Cell* **3**, 311-7.
- Bi, X. and Broach, J. R. (1997). DNA in transcriptionally silent chromatin assumes a distinct topology that is sensitive to cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **17**, 7077-87.
- Bille, J., Marchetti, O. and Calandra, T. (2005). Changing face of health-care associated fungal infections. *Curr Opin Infect Dis* **18**, 314-9.
- Birse, C. E., Irwin, M. Y., Fonzi, W. A. and Sypherd, P. S. (1993). Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* **61**, 3648-55.
- Blander, G. and Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* **73**, 417-35.
- Bockmuhl, D. P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A. and Ernst, J. F. (2001). Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**, 1243-57.
- Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P. and Blondin, B. (1997). Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol* **179**, 4929-36.
- Borges-Walmsley, M. I. and Walmsley, A. R. (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* **8**, 133-41.
- Brakhage, A. A. (2005). Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Curr Drug Targets* **6**, 875-86.
- Brand, A., MacCallum, D. M., Brown, A. J., Gow, N. A. and Odds, F. C. (2004). Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. *Eukaryot Cell* **3**, 900-9.
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X. and Johnson, A. D. (2000). Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**, 31-44.

- Braun, B. R., Kadosh, D. and Johnson, A. D. (2001). NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J* **20**, 4753-61.
- Brown, D. H., Jr., Giusani, A. D., Chen, X. and Kumamoto, C. A. (1999). Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol* **34**, 651-62.
- Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K. E., Garfinkel, D. J. and Curcio, M. J. (1997). Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev* **11**, 255-69.
- Buffo, J., Herman, M. A. and Soll, D. R. (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**, 21-30.
- Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M. and Monk, B. C. (2007). *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology* **153**, 3211-7.
- Cao, F., Lane, S., Raniga, P. P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K., Chen, J. and Liu, H. (2006). The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**, 295-307.
- Chen, W. N., Balzi, E., Capieaux, E., Choder, M. and Goffeau, A. (1991). The DNA sequencing of the 17 kb HindIII fragment spanning the LEU1 and ATE1 loci on chromosome VII from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the PDR6 gene, a new member of the genetic network controlling pleiotropic drug resistance. *Yeast* **7**, 287-99.
- Chen, X., Magee, B. B., Dawson, D., Magee, P. T. and Kumamoto, C. A. (2004). Chromosome 1 trisomy compromises the virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **51**, 551-65.
- Chibana, H., Beckerman, J. L. and Magee, P. T. (2000). Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res* **10**, 1865-77.
- Chibana, H., Iwaguchi, S., Homma, M., Chindamporn, A., Nakagawa, Y. and Tanaka, K. (1994). Diversity of tandemly repetitive sequences due to short periodic repetitions in the chromosomes of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **176**, 3851-8.
- Chindamporn, A., Nakagawa, Y., Homma, M., Chibana, H., Doi, M. and Tanaka, K. (1995). Analysis of the chromosomal localization of the repetitive sequences (RPSs) in *Candida albicans*. *Microbiology* **141** ( Pt 2), 469-76.
- Chindamporn, A., Nakagawa, Y., Mizuguchi, I., Chibana, H., Doi, M. and Tanaka, K. (1998). Repetitive sequences (RPSs) in the chromosomes of *Candida albicans* are sandwiched between two novel stretches, HOK and RB2, common to each chromosome. *Microbiology* **144** ( Pt 4), 849-57.
- Cloutier, M., Castilla, R., Bolduc, N., Zelada, A., Martineau, P., Bouillon, M., Magee, B. B., Passeron, S., Giasson, L. and Cantore, M. L. (2003). The two isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit are involved in the control of dimorphism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **38**, 133-41.
- Conlan, R. S. and Tzamarias, D. (2001). Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J Mol Biol* **309**, 1007-15.
- Costigan, C., Gehrung, S. and Snyder, M. (1992). A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol* **12**, 1162-78.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D. Y. and Whiteway, M. (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**, 2713-21.

- Deresinski, S. C. and Stevens, D. A. (2003). Caspofungin. *Clin Infect Dis* **36**, 1445-57.
- Douglas, C. M., D'Ippolito, J. A., Shei, G. J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J. A., Li, W., Abruzzo, G. K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A. and Kurtz, M. B. (1997). Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2471-9.
- Dünkler, A. (2007). RhoGTPasen in *Candida albicans* und deren Einfluss auf das polarisierte Wachstum und die Zytokinese.
- Dupont, P. F. (1995). *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. *J Am Podiatr Med Assoc* **85**, 104-15.
- Eckert, S. E. (2007). Regulation of morphogenesis in *Candida* species. In: *Candida Comparative and functional genomics* (d'Enfert, C. and Hube, B., eds) Horizon bioscience, Norfolk, U.K., 263-291.
- Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N. and Wenzel, R. P. (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* **29**, 239-44.
- Edwards, J. E., Jr. (1999). in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease* (Mandell, G. L., Bennett, J. E., and Dolin, R., eds) 5th Ed., Churchill Livingstone, Philadelphia, 2656-2674.
- Fang, H. M. and Wang, Y. (2006). RA domain-mediated interaction of Cdc35 with Ras1 is essential for increasing cellular cAMP level for *Candida albicans* hyphal development. *Mol Microbiol* **61**, 484-96.
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B. and Fink, G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 6339-46.
- Fichtner, L., Schulze, F. and Braus, G. H. (2007). Differential Flo8p-dependent regulation of FLO1 and FLO11 for cell-cell and cell-substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. *Mol Microbiol* **66**, 1276-89.
- Fonzi, W. A. (2002). Role of pH response in *Candida albicans* virulence. *Mycoses* **45 Suppl 1**, 16-21.
- Fonzi, W. A. and Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-28.
- Frieman, M. B., McCaffery, J. M. and Cormack, B. P. (2002). Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol* **46**, 479-92.
- Fu, Y., Ibrahim, A. S., Sheppard, D. C., Chen, Y. C., French, S. W., Cutler, J. E., Filler, S. G. and Edwards, J. E., Jr. (2002). *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* **44**, 61-72.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W. A., Belanger, P. H., Edwards, J. E., Jr. and Filler, S. G. (1998). Expression of the *Candida albicans* gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* **66**, 1783-6.
- Fujita, A., Kikuchi, Y., Kuhara, S., Misumi, Y., Matsumoto, S. and Kobayashi, H. (1989). Domains of the SFL1 protein of yeasts are homologous to Myc oncoproteins or yeast heat-shock transcription factor. *Gene* **85**, 321-8.
- Galeote, V. A., Alexandre, H., Bach, B., Delobel, P., Dequin, S. and Blondin, B. (2007). Sfl1p acts as an activator of the HSP30 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **52**, 55-63.
- Gancedo, J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 107-23.
- Garcia-Sanchez, S., Mavor, A. L., Russell, C. L., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, B. and Brown, A. J. (2005). Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **16**, 2913-25.



- Gaur, M., Choudhury, D. and Prasad, R. (2005). Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 3-15.
- Gaur, N. K. and Klotz, S. A. (1997). Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **65**, 5289-94.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. and Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**, 179-82.
- Gimeno, C. J. and Fink, G. R. (1992). The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science* **257**, 626.
- Gola, S., Martin, R., Walther, A., Dunkler, A. and Wendland, J. (2003). New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast* **20**, 1339-47.
- Goodwin, T. J. and Poulter, R. T. (2000). Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*. *Genome Res* **10**, 174-91.
- Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L. and Zakian, V. A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**, 751-62.
- Green, C. B., Zhao, X. and Hoyer, L. L. (2005). Use of green fluorescent protein and reverse transcription-PCR to monitor *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression in a murine model of disseminated candidiasis. *Infect Immun* **73**, 1852-5.
- Green, C. B., Zhao, X., Yeater, K. M. and Hoyer, L. L. (2005). Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells. *Microbiology* **151**, 1051-60.
- Groes, M., Teilmann, K., Olesen, K., Poulsen, F. M. and Henriksen, A. (2002). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the carbohydrate-binding domain of flocculin, a cell-adhesion molecule from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 2135-7.
- Guarro, J., GeneJ and Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **12**, 454-500.
- Guo, B., Styles, C. A., Feng, Q. and Fink, G. R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12158-63.
- Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., Phelan, M., Morgan, J., Lee-Yang, W., Ciblak, M. A., Benjamin, L. E., Sanza, L. T., Huie, S., Yeo, S. F., Brandt, M. E. and Warnock, D. W. (2004). Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* **42**, 1519-27.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.
- Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S. H. and Zhao, X. (2007). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family - a sticky pursuit. *Med Mycol*, 1-15.

- Hoyer, L. L. (2001a). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 176-80.
- Hoyer, L. L., Fundyga, R., Hecht, J. E., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. and Arnold, J. (2001b). Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* **157**, 1555-67.
- Hoyer, L. L., Clevenger, J., Hecht, J. E., Ehrhart, E. J. and Poulet, F. M. (1999). Detection of Als proteins on the cell wall of *Candida albicans* in murine tissues. *Infect Immun* **67**, 4251-5.
- Hoyer, L. L., Payne, T. L. and Hecht, J. E. (1998). Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol* **180**, 5334-43.
- Hoyer, L. L., Scherer, S., Shatzman, A. R. and Livi, G. P. (1995). *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol* **15**, 39-54.
- Hube, B. and Naglik, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**, 1997-2005.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. and Schafer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* **174**, 362-74.
- Hull, C. M., Raisner, R. M. and Johnson, A. D. (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**, 307-10.
- Hwang, C. S., Oh, J. H., Huh, W. K., Yim, H. S. and Kang, S. O. (2003). Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **47**, 1029-43.
- Iwaguchi, S., Homma, M., Chibana, H. and Tanaka, K. (1992). Isolation and characterization of a repeated sequence (RPS1) of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **138**, 1893-900.
- Iwaguchi, S., Suzuki, M., Sakai, N., Nakagawa, Y., Magee, P. T. and Suzuki, T. (2004). Chromosome translocation induced by the insertion of the URA blaster into the major repeat sequence (MRS) in *Candida albicans*. *Yeast* **21**, 619-34.
- Jacoby, J. J., Nilius, S. M. and Heinisch, J. J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Gen Genet* **258**, 148-55.
- Janbon, G., Sherman, F. and Rustchenko, E. (1998). Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5150-5.
- Jensen-Pergakes, K. L., Kennedy, M. A., Lees, N. D., Barbuch, R., Koegel, C. and Bard, M. (1998). Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1160-7.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W. and Scherer, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7329-34.
- Kadosh, D. and Johnson, A. D. (2005). Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell* **16**, 2903-12.
- Kaiser, B., Munder, T., Saluz, H. P., Kunkel, W. and Eck, R. (1999). Identification of a gene encoding the pyruvate decarboxylase gene regulator CaPdc2p from *Candida albicans*. *Yeast* **15**, 585-91.

- Kaiser, C. (1994). *Methods in yeast genetics*. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Kamai, Y., Kubota, M., Hosokawa, T., Fukuoka, T. and Filler, S. G. (2002). Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* **70**, 5256-8.
- Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. and Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 373-83.
- Kauffman, C. A. (2006). Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 35-40.
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U. and Einsele, H. (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* **400**, 80-2.
- Kim, T. S., Kim, H. Y., Yoon, J. H. and Kang, H. S. (2004). Recruitment of the Swi/Snf complex by Ste12-Tec1 promotes Flo8-Mss11-mediated activation of STA1 expression. *Mol Cell Biol* **24**, 9542-56.
- Klotz, S. A., Gaur, N. K., De Armond, R., Sheppard, D., Khardori, N., Edwards, J. E., Jr., Lipke, P. N. and El-Azizi, M. (2007). *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med Mycol* **45**, 363-70.
- Kobayashi, O., Yoshimoto, H. and Sone, H. (1999). Analysis of the genes activated by the FLO8 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **36**, 256-61.
- Kohler, G. A., White, T. C. and Agabian, N. (1997). Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* **179**, 2331-8.
- Kohler, J. R. and Fink, G. R. (1996). *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13223-8.
- Kontoyiannis, D. P., Sagar, N. and Hirschi, K. D. (1999). Overexpression of Erg11p by the regulatable GAL1 promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2798-800.
- Kunze, D., Melzer, I., Bennett, D., Sanglard, D., MacCallum, D., Norskau, J., Coleman, D. C., Odds, F. C., Schafer, W. and Hube, B. (2005). Functional analysis of the phospholipase C gene CaPLC1 and two unusual phospholipase C genes, CaPLC2 and CaPLC3, of *Candida albicans*. *Microbiology* **151**, 3381-94.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G. and Francois, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147-66.
- Kurtz, M. B. and Douglas, C. M. (1997). Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J Med Vet Mycol* **35**, 79-86.
- Lambrechts, M. G., Bauer, F. F., Marmur, J. and Pretorius, I. S. (1996). Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8419-24.
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R. and Liu, H. (2001). DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **276**, 48988-96.
- Lang, G. I. and Murray, A. W. (2008). Estimating the per-base-pair mutation rate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**, 67-82.
- Lasker, B. A., Page, L. S., Lott, T. J. and Kobayashi, G. S. (1992). Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive element 2. *Gene*

- 116**, 51-7.
- Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I. D., Clark, K. L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N. A., Brown, A. J. and Thomas, D. Y. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13217-22.
- Lee, K. H., Jun, S., Hur, H. S., Ryu, J. J. and Kim, J. (2005). *Candida albicans* protein analysis during hyphal differentiation using an integrative HA-tagging method. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 784-90.
- Legrand, M., Forche, A., Selmecki, A., Chan, C., Kirkpatrick, D. T. and Berman, J. (2008). Haplotype mapping of a diploid non-meiotic organism using existing and induced aneuploidies. *PLoS Genet* **4**, e1.
- Li, F. and Palecek, S. P. (2003). EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* **2**, 1266-73.
- Li, Y., Su, C., Mao, X., Cao, F. and Chen, J. (2007). Roles of *Candida albicans* Sfl1 in hyphal development. *Eukaryot Cell* **6**, 2112-21.
- Liu, H., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**, 967-78.
- Liu, H., Kohler, J. and Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* **266**, 1723-6.
- Lo, W. S. and Dranginis, A. M. (1996). FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* **178**, 7144-51.
- Lo, W. S. and Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 161-71.
- Loo, S. and Rine, J. (1994). Silencers and domains of generalized repression. *Science* **264**, 1768-71.
- Lopez-Ribot, J. L. (2005). *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr Biol* **15**, R453-5.
- Magee, B. B. and Magee, P. T. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science* **289**, 310-3.
- Magee, B. B. and Magee, P. T. (2005). Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* **22**, 187-93.
- Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S., Bellens, D., Verhasselt, P., Luyten, W., Borgers, M., Ramaekers, F. C., Odds, F. C. and Bossche, H. V. (1999). Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145** ( Pt 10), 2701-13.
- Marr, K. A., Patterson, T. and Denning, D. (2002). Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am* **16**, 875-94, vi.
- Martin, H., Castellanos, M. C., Cenamor, R., Sanchez, M., Molina, M. and Nombela, C. (1996). Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLT2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants. *Curr Genet* **29**, 516-22.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. and Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 1511-9.
- Martin, R. (2007). Molekulare Analyse des Aktinzytoskeletts in *Candida albicans*.
- Miller, M. G. and Johnson, A. D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**, 293-302.

- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Morschhäuser, J. (2003). Resistenzen und Resistenzmechanismen: Wie „entkommen“ Pilze der Therapie. *Pharm. Unserer Zeit* **2**, 124-129.
- Murad, A. M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J. and Brown, A. J. (2001). Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* **42**, 981-93.
- Nakayama, H., Nakayama, N., Arisawa, M. and Aoki, Y. (2001). In vitro and in vivo effects of 14 $\alpha$ -demethylase (ERG11) depletion in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3037-45.
- Nantel, A. (2006). The long hard road to a completed *Candida albicans* genome. *Fungal Genet Biol* **43**, 311-5.
- Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., H Marcus, D., Marcil, A., Bouin, A. P., Sensen, C. W., Hogues, H., van het Hoog, M., Gordon, P., Rigby, T., Benoit, F., Tessier, D. C., Thomas, D. Y. and Whiteway, M. (2002). Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* **13**, 3452-65.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. and Pla, J. (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 245-68.
- Nobile, C. J. and Mitchell, A. P. (2005). Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol* **15**, 1150-5.
- Noble, S. M. and Johnson, A. D. (2005). Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**, 298-309.
- Nolte, F. S., Parkinson, T., Falconer, D. J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R. and Wingard, J. R. (1997). Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 196-9.
- Odds, F. C., Webster, C. E., Mayuranathan, P. and Simmons, P. D. (1988). *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* **26**, 277-83.
- Oh, S. H., Cheng, G., Nuessen, J. A., Jajko, R., Yeater, K. M., Zhao, X., Pujol, C., Soll, D. R. and Hoyer, L. L. (2005). Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and clade specificity of ALS3 alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain. *Microbiology* **151**, 673-81.
- Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J. H., Pappas, P. G., Hamill, R. J., Larsen, R. A., Horowitz, H. W., Powderly, W. G., Hyslop, N., Kauffman, C. A., Cleary, J., Mangino, J. E. and Lee, J. (2003). Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3149-54.
- Pan, X. and Heitman, J. (2002). Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**, 3981-93.
- Park, J. I., Collinson, E. J., Grant, C. M. and Dawes, I. W. (2005). Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. *J Biol Chem* **280**, 2529-35.
- Perepnikhatka, V., Fischer, F. J., Niimi, M., Baker, R. A., Cannon, R. D., Wang, Y. K., Sherman, F. and Rustchenko, E. (1999). Specific chromosome alterations in fluconazole-resistant mutants of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 4041-9.
- Perez-Martin, J., Uria, J. A. and Johnson, A. D. (1999). Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a SIR2 gene. *EMBO J* **18**, 2580-92.

- Pfaller, M. A. and Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **42**, 4419-31.
- Pfaller, M. A., Jones, R. N., Messer, S. A., Edmond, M. B. and Wenzel, R. P. (1998). National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. *Diagn Microbiol Infect Dis* **30**, 121-9.
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P. and Lopez-Ribot, J. L. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* **4**, 633-8.
- Rigden, D. J., Mello, L. V. and Galperin, M. Y. (2004). The PA14 domain, a conserved all-beta domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. *Trends Biochem Sci* **29**, 335-9.
- Rine, J. and Herskowitz, I. (1987). Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**, 9-22.
- Robertson, L. S. and Fink, G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13783-7.
- Rocha, C. R., Schroppel, K., Marcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B. N., Thomas, D. Y., Whiteway, M. and Leberer, E. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **12**, 3631-43.
- Roncero, C. and Duran, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**, 1180-5.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H. J., Madhani, H. and Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J* **18**, 1257-69.
- Russell, C. L. and Brown, A. J. (2005). Expression of one-hybrid fusions with *Staphylococcus aureus* *lexA* in *Candida albicans* confirms that Nrg1 is a transcriptional repressor and that Gcn4 is a transcriptional activator. *Fungal Genet Biol* **42**, 676-83.
- Samaranayake, Y. H., Dassanayake, R. S., Jayatilake, J. A., Cheung, B. P., Yau, J. Y., Yeung, K. W. and Samaranayake, L. P. (2005). Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Med Microbiol* **54**, 583-93.
- Santos, M. A., Ueda, T., Watanabe, K. and Tuite, M. F. (1997). The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation? *Mol Microbiol* **26**, 423-31.
- Schaub, Y., Dunkler, A., Walther, A. and Wendland, J. (2006). New pFA-cassettes for PCR-based gene manipulation in *Candida albicans*. *J Basic Microbiol* **46**, 416-29.
- Selmecki, A., Forche, A. and Berman, J. (2006). Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* **313**, 367-70.
- Sharkey, L. L., McNemar, M. D., Saporito-Irwin, S. M., Sypherd, P. S. and Fonzi, W. A. (1999). HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J Bacteriol* **181**, 5273-9.
- Shen, H., Iha, H., Yaguchi, S. and Tsurugi, K. (2006). The mechanism by which overexpression of Gts1p induces flocculation in a FLO8-inactive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**, 914-23.
- Shepherd, M. G., Poulter, R. T. and Sullivan, P. A. (1985). *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu Rev Microbiol* **39**, 579-614.

- Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Phan, Q. T., Fu, Y., Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Zhang, M., Waring, A. J. and Edwards, J. E., Jr. (2004). Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **279**, 30480-9.
- Sheth, C. C., Johnson, E., Baker, M. E., Haynes, K. and Muhlschlegel, F. A. (2005). Phenotypic identification of *Candida albicans* by growth on chocolate agar. *Med Mycol* **43**, 735-8.
- Smith, J. S. and Boeke, J. D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* **11**, 241-54.
- Soll, D. R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* **81**, 101-10.
- Soll, D. R. (2004). Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays* **26**, 10-20.
- Song, W. and Carlson, M. (1998). Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *EMBO J* **17**, 5757-65.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. and Ernst, J. F. (2000). Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **35**, 386-96.
- Staab, J. F., Bahn, Y. S., Tai, C. H., Cook, P. F. and Sundstrom, P. (2004). Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem* **279**, 40737-47.
- Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L. and Sundstrom, P. (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**, 1535-8.
- Staab, J. F. and Sundstrom, P. (1998). Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*. *Yeast* **14**, 681-6.
- Staab, J. F., Ferrer, C. A. and Sundstrom, P. (1996). Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **271**, 6298-305.
- Staib, P. and Morschhauser, J. (2005). Differential expression of the NRG1 repressor controls species-specific regulation of chlamydospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol Microbiol* **55**, 637-52.
- Staib, P. and Morschhauser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses* **50**, 1-12.
- Stratford, M. (1992a). Yeast flocculation: a new perspective. *Adv Microb Physiol* **33**, 2-71.
- Stratford, M. (1992b). Yeast flocculation: reconciliation of physiological and genetic viewpoints. *Yeast* **8**, 25-38.
- Sudbery, P., Gow, N. and Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**, 317-24.
- Sudbery, P. E. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol* **41**, 19-31.
- Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**, 461-9.
- Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A. and Ernst, J. F. (2003). Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the EFG1 gene. *J Mol Biol* **329**, 949-62.
- Teunissen, A. W. and Steensma, H. Y. (1995). Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* **11**, 1001-13.

- Titov, A. A. and Blobel, G. (1999). The karyopherin Kap122p/Pdr6p imports both subunits of the transcription factor IIA into the nucleus. *J Cell Biol* **147**, 235-46.
- Thrash-Bingham, C. and Gorman, J. A. (1993). Identification, characterization and sequence of *Candida albicans* repetitive DNAs Rel-1 and Rel-2. *Curr Genet* **23**, 455-62.
- Tripathi, G., Wiltshire, C., Macaskill, S., Tournu, H., Budge, S. and Brown, A. J. (2002). Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J* **21**, 5448-56.
- Tzung, K. W., Williams, R. M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R. W. and Agabian, N. (2001). Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3249-53.
- Ueno, K., Uno, J., Nakayama, H., Sasamoto, K., Mikami, Y. and Chibana, H. (2007). Development of a highly efficient gene targeting system induced by transient repression of YKU80 expression in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **6**, 1239-47.
- van het Hoog, M., Rast, T. J., Martchenko, M., Grindle, S., Dignard, D., Hogues, H., Cuomo, C., Berriman, M., Scherer, S., Magee, B. B., Whiteway, M., Chibana, H., Nantel, A. and Magee, P. T. (2007). Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol* **8**, R52.
- Verstrepen, K. J., Jansen, A., Lewitter, F. and Fink, G. R. (2005). Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet* **37**, 986-90.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. and Delvaux, F. R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 197-205.
- Vinces, M. D., Haas, C. and Kumamoto, C. A. (2006). Expression of the *Candida albicans* morphogenesis regulator gene CZF1 and its regulation by Efg1p and Czf1p. *Eukaryot Cell* **5**, 825-35.
- Weig, M., Gross, U. and Muhlschlegel, F. (1998). Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. *Trends Microbiol* **6**, 468-70.
- Wellington, M., Kabir, M. A. and Rustchenko, E. (2006). 5-fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in genetically manipulated strains of *Candida albicans*. *Mycologia* **98**, 393-8.
- Wellington, M. and Rustchenko, E. (2005). 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. *Yeast* **22**, 57-70.
- Wendland, J., Hellwig, D., Walther, A., Sickinger, S., Shadkchan, Y., Martin, R., Bauer, J., Osherov, N., Tretiakov, A. and Saluz, H. P. (2006). Use of the Porcine Intestinal Epithelium (PIE)-Assay to analyze early stages of colonization by the human fungal pathogen *Candida albicans*. *J Basic Microbiol* **46**, 513-23.
- White, T. C., Marr, K. A. and Bowden, R. A. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**, 382-402.
- Whiteway, M. and Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **61**, 529-53.
- Whiteway, M. and Oberholzer, U. (2004). *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **7**, 350-7.
- Wilson, R. B., Davis, D. and Mitchell, A. P. (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**, 1868-74.
- Wirsching, S., Michel, S., Kohler, G. and Morschhauser, J. (2000). Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol* **182**, 400-4.



- Zhao, X., Oh, S. H., Cheng, G., Green, C. B., Nuessen, J. A., Yeater, K., Leng, R. P., Brown, A. J. and Hoyer, L. L. (2004). ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* **150**, 2415-28.
- Zhao, X., Oh, S. H. and Hoyer, L. L. (2007). Unequal contribution of ALS9 alleles to adhesion between *Candida albicans* and human vascular endothelial cells. *Microbiology* **153**, 2342-50.
- Zhao, X., Oh, S. H., Jajko, R., Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Pujol, C., Soll, D. R. and Hoyer, L. L. (2007). Analysis of ALS5 and ALS6 allelic variability in a geographically diverse collection of *Candida albicans* isolates. *Fungal Genet Biol* **44**, 1298-309.
- Zhao, X., Oh, S. H., Yeater, K. M. and Hoyer, L. L. (2005). Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology* **151**, 1619-30.

## 5.2 Eigene Veröffentlichungen

- Bauer, J. and Wendland, J. (2007). *Candida albicans* Sfl1 suppresses flocculation and filamentation. *Eukaryot Cell* **6**, 1736-44.
- Martin, R., Hellwig, D., Schaub, Y., Bauer, J., Walther, A. and Wendland, J. (2007). Functional analysis of *Candida albicans* genes whose *Saccharomyces cerevisiae* homologues are involved in endocytosis. *Yeast* **24**, 511-22.
- Wendland, J., Hellwig, D., Walther, A., Sickinger, S., Shadkchan, Y., Martin, R., Bauer, J., Oshero, N., Tretiakov, A. and Saluz, H. P. (2006). Use of the Porcine Intestinal Epithelium (PIE)-Assay to analyze early stages of colonization by the human fungal pathogen *Candida albicans*. *J Basic Microbiol* **46**, 513-23.

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1. Morphologieformen von <i>Candida albicans</i> .	6
Abbildung 2. Gendisruption mittels PCR-generierter Disruptionskassetten.	22
Abbildung 3. Verifizierung der <i>Candida albicans</i> Mutanten.	26
Abbildung 4. Schematische Darstellung des Ein-Hybrid-Assays.	27
Abbildung 5. HKI-Substanzen mit antifungaler Wirkung.	31
Abbildung 6. Sequenzvergleich <i>SFL1</i> von <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. albicans</i> .	35
Abbildung 7. <i>Candida albicans</i> <i>SFL1</i> Gen- und Proteinsequenz.	36
Abbildung 8. Sequenzanalyse und -vergleich von <i>CaSFL1</i> .	37
Abbildung 9. Disruptionsnachweis von <i>SFL1</i> mittels PCR.	38
Abbildung 10. Zellmorphologie der <i>sfl1</i> -Deletionsmutante.	39
Abbildung 11. Koloniemorphologie <i>sfl1</i> -Deletionsstamm.	40
Abbildung 12. Quantifizierung der Zellaggregatbildung mittels optischer Dichte.	41
Abbildung 13. Zellaggregatbildung der <i>sfl1</i> -Deletionsmutante	42
Abbildung 14. Einfluss von pH-Wert auf Zellaggregation.	43
Abbildung 15. Einfluss der Glukosekonzentration auf die Flockulierung.	44
Abbildung 16. Einfluss von Mannose auf das Wachstumsverhalten.	44
Abbildung 17. EGTA-Einfluss auf Wachstumsmorphologie.	45
Abbildung 18. Wirkung zellwand- und membranzerstörender Substanzen	46
Abbildung 19. <i>MET3</i> -Promotor reguliertes <i>SFL1</i> .	47
Abbildung 20. Quantifizierung der GFP-Signale mit unterschiedlichen Promotoren.	48
Abbildung 21. Morphologie unter mikroaerophilen Bedingungen	49
Abbildung 22. Hyphenwachstum der <i>sfl1</i> -Deletionsmutante.	50
Abbildung 23. Sfl1-GFP Lokalisierung	51
Abbildung 24. Slf1-GFP-Signal in Hyphenzellen.	52
Abbildung 25. Ein-Hybrid-Assay: X-Gal-Überschichtung	53
Abbildung 26. Ein-Hybrid-Assay: Quantifizierung mit ONPG-Assay	54
Abbildung 27. Genexpression hyphenspezifischer Gene in <i>sfl1</i> -Deletionsmutante.	55
Abbildung 28. Potentielle <i>SFL1</i> -Bindestellen im Promotorbereich der <i>ALS</i> -Gene	57
Abbildung 29. Überexpression von <i>ALS1</i> und <i>ALS3</i>	58
Abbildung 30. Schema der Lokalisierung der <i>TLO</i> -Gene auf Chromosomen	60
Abbildung 31. Vergleich der <i>TLO</i> -Proteinsequenzen	61
Abbildung 32. Gruppierung der <i>TLO</i> -Gene	62
Abbildung 33. <i>TLO</i> -Sequenzen in anderen Spezies.	63
Abbildung 34. Quantifizierung von <i>ura3</i> - Zellen durch 5-FOA	64

Abbildung 35. Testung des Ura-Status der mit 5-FOA selektierten Mutanten .....	65
Abbildung 36. Kolonie-PCR von GC107 nach 5-FOA-Selektion .....	66
Abbildung 37. Verifizierung der <i>tlo34</i> -Deletionsmutanten.....	66
Abbildung 38. Zellmorphologie der <i>tlo34</i> -Deletionsmutante .....	67
Abbildung 39. Hemmhoftest antifungaler Substanzen.....	68
Abbildung 40. Minimale Hemmkonzentrationen der antifungalen Substanzen.....	69
Abbildung 41. Identifizierung sensibler und resistenter Deletionsmutanten .....	70
Abbildung 42. Substanztest auf Schweinedarmepithel .....	72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stammliste .....	16
Tabelle 2 Verwendete Plasmide .....	20
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide.....	23
Tabelle 4. Zellaggregatbildung bei <i>sflI</i> -Deletionsmutante.....	41
Tabelle 5. Auflistung aller <i>TLO</i> -Gene .....	59
Tabelle 6. Auflistung resistenter und sensitiver Deletionsmutanten .....	71

**Abkürzungsverzeichnis**

5-FOA	5'-Fluoorotsäure
ALS	Agglutinin-ähnliche Sequenz ( <u>a</u> gglutinin- <u>l</u> ike <u>s</u> equen <u>e</u> )
bp	Basenpaar (base pair)
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CLP	Chromosomenlängenpolimorphismus
CTA	<i>Candida albicans</i> Transkriptionsaktivator
CSM	Minimalmedium mit Aminosäuren ( <u>C</u> omplete <u>s</u> ynthetic <u>d</u> efined media)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff
DIC	Differential-Interferenz-Kontrastverfahren ( <u>D</u> ifferential <u>i</u> nterference <u>c</u> ontrast)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <u>D</u> esoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	Grün-Fluoreszierendes-Protein (green <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
GTP	Guanosintriphosphat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
kan-MX4	Kanamycin-Resistenzgen, Neomycinphosphotransferase, NPT1
KBE	koloniebildende Einheiten
KTRL	Kontrolle
min	Minute
ORF	offener Leserahmen ( <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> ram <u>e</u> )
PBS	Phosphatpuffer ( <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> ea <u>ct</u> ion)
RNA	Ribonukleinsäure ( <u>R</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
SD	Minimalmedium ( <u>S</u> ynthetic <u>d</u> efined media)
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat)
sec	Sekunde
SFL1	Suppressor der Flockulierung ( <u>s</u> uppressor of <u>f</u> locculation)
TLO	Telomer verbundene Gene ( <u>t</u> elomere associated)
UTP	Uridin-tri-phosphat
UMP	Uridin-mono-phosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
YNB	Salz-Vitamin-Gemisch ( <u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase)
YPD	Vollmedium ( <u>Y</u> east- <u>P</u> eptone- <u>D</u> extrose)

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn entsprechen, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Rudolstadt, den

Janine Bauer

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Mir ist die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts wurde ich von Prof. Dr. Jürgen Wendland unterstützt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen es haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leitungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurde von mir nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Rudolstadt, den

Janine Bauer

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Janine Bauer  
Geburtstag: 29. September 1980  
Geburtsort: Rudolstadt  
Familienstand: verheiratet

### Bildungsweg:

seit 12/2007	Fortsetzung und Beendigung meiner Promotion am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut in Jena mit dem Thema „ <i>SFLI</i> kodiert für einen Inhibitor der Zell-Zellaggregation und der Hyphenbildung in <i>Candida albicans</i> “
12/2006 – 11/2007	Fortsetzung meiner Promotion am Carlsberg Research Center in Kopenhagen mit der Identifizierung und Charakterisierung der <i>TLO</i> -Genfamilie in <i>C. albicans</i>
12/2004 – 11/2006	Doktorandin am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut in Jena mit der Themenstellung: „Untersuchungen zu den molekularen Wirkmechanismen antifungaler Substanzen in <i>C. albicans</i> “
10/1999 – 11/2004	Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena; Abschluss Diplom mit 1,6; Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Genetik, Medizinische Mikrobiologie und Phytopathologie; Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie über „Vergleichende Untersuchungen zwischen nativer und rekombinanter Form des Sialinsäure-spezifischen Lektins CHA-I der Gartenschnirkelschnecke <i>Cepaea hortensis</i> “
08/1990 – 07/1999	Abitur am Gymnasium Fridericianum in Rudolstadt, Hauptfächer: Biologie und Deutsch
08/1987 – 09/1990	Staatliche Grundschule Friedrich-Schiller in Rudolstadt

Rudolstadt, den

Janine Bauer



## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Jürgen Wendland für die äußerst lehrreiche Zusammenarbeit an dieser Dissertation und die einzigartige Möglichkeit, einen Teil meiner praktischen Arbeiten in Kopenhagen durchführen zu können, danken. Mir werden insbesondere die hilfreichen fachlichen Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft bei meinen Versuchsideen und Laborproblemen fehlen. Ebenso bedanke ich mich für seine Bereitschaft, ein Gutachten für diese Arbeit anzufertigen.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen, Yvonne, Alex, Ronny, Andrea und Nicole. Bei Yvonne und Ronny möchte ich mich für die freundliche und diskussionsreiche Zusammenarbeit am Hans-Knöll-Institut bedanken. Alex, Andrea und Nicole, die mich auf meinem Weg nach Dänemark begleitet haben, danke ich für die Zeit in Kopenhagen, auch wenn so mancher Labortag zur Labornacht wurde. Besonderer Dank gilt Andrea für ihre Unterstützung bei den Mikroskoparbeiten. Bei meinen schwedischen Kollegen, Patrick und Sia, und meiner Nachfolgerin Anke möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre im Labor des Carlsberg Research Center und die stete Bereitschaft zur Problemlösung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. H. P. Saluz und PD Dr. M. Weig für die Erstellung eines Gutachtens für diese Dissertation ganz herzlich bedanken.

Meinem Mann, Sven, meinen Eltern und meiner Oma danke ich für die stete Unterstützung und der unendlichen Geduld während meiner Promotion. Ihr wart immer für mich da, auch als ich so weit weg war von euch. Ohne Euch hätte ich nie so viel erreicht. Danke.

Anhang

**Nr. 10126132****sensitive Deletionsmutanten**

<b>Pos.</b>	<b>Bez.</b>	<b>Funktion</b>
01 E3	<i>CCR4</i>	Component of the CCR4-NOT transcriptional complex, which is involved in regulation of gene expression; component of the major cytoplasmic deadenylase, which is involved in mRNA poly(A) tail shortening
07 D2	<i>SWE1</i>	Protein kinase that regulates the G2/M transition by inhibition of Cdc28p kinase activity; localizes to the nucleus and to the daughter side of the mother-bud neck; homolog of <i>S. pombe</i> Wee1p; potential Cdc28p substrate
07 D4	<i>ERG6</i>	Delta(24)-sterol C-methyltransferase, converts zymosterol to fecosterol in the ergosterol biosynthetic pathway by methylating position C-24
07 F2	<i>SOK2</i>	Nuclear protein that plays a regulatory role in the cyclic AMP (cAMP)-dependent protein kinase (PKA) signal transduction pathway; negatively regulates pseudohyphal differentiation; homologous to several transcription factors
07 G8	<i>HOF1</i>	Bud neck-localized, SH3 domain-containing protein required for cytokinesis; regulates actomyosin ring dynamics and septin localization; interacts with the formins, Bni1p and Bnr1p, and with Cyk3p, Vrp1p, and Bni5p
11 B3	<i>URE2</i>	Nitrogen catabolite repression regulator that acts by inhibition of GLN3 transcription in good nitrogen source; altered form of Ure2p creates [URE3] prion
11 E3	<i>YNL193W</i>	hyp. protein
13 F2	<i>PET123</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit; PET123 exhibits genetic interactions with PET122, which encodes a COX3 mRNA-specific translational activator
13 H4	<i>SER1</i>	3-phosphoserine aminotransferase, catalyzes the formation of phosphoserine from 3-phosphohydroxypyruvate, required for serine and glycine biosynthesis; regulated by the general control of amino acid biosynthesis mediated by Gcn4p
14 A2	<i>SNF2</i>	Catalytic subunit of the 11-subunit SWI/SNF chromatin remodeling complex involved in transcriptional regulation; contains DNA-stimulated ATPase activity; functions interdependently in transcriptional activation with Snf5p and Snf6p
17 E11	<i>TAF14</i>	Subunit (30 kDa) of TFIID, TFIIF, and SWI/SNF complexes, involved in RNA polymerase II transcription initiation and in chromatin modification, contains a YEATS domain
21 G9	<i>RVS161</i>	Amphiphysin-like lipid raft protein; subunit of a complex (Rvs161p-Rvs167p) that regulates polarization of the actin cytoskeleton, endocytosis, cell polarity, cell fusion and viability following starvation or osmotic stress
22 D6	<i>SIR2</i>	Conserved NAD <sup>+</sup> dependent histone deacetylase of the Sirtuin family involved in regulation of lifespan; plays roles in silencing at HML, HMR, telomeres, and the rDNA locus; negatively regulates initiation of DNA replication
23 F6	<i>DHH1</i>	Cytoplasmic DExD/H-box helicase, stimulates mRNA decapping, coordinates distinct steps in mRNA function and decay, interacts with both the decapping and deadenylase complexes, may have a role in mRNA export and translation
24 A2	<i>ARF1</i>	ADP-ribosylation factor, GTPase of the Ras superfamily involved in regulation of coated formation vesicles in intracellular trafficking within the Golgi; functionally interchangeable with Arf2
26 C6	<i>NGG1</i>	Transcriptional regulator involved in glucose repression of Gal4p-regulated genes; component of transcriptional adaptor and histone acetyltransferase complexes, the ADA complex, the SAGA complex, and the SLIK complex
28 B8	<i>VID21</i>	Component of the NuA4 histone acetyltransferase complex
28 C12	<i>GET2</i>	Protein required for meiotic nuclear division; appears to function in DNA replication and damage response; may be involved in cell wall function

**Nr. 10126132****sensitive Deletionsmutanten**

<b>Pos.</b>	<b>Bez.</b>	<b>Funktion</b>
28 E6	<i>ILV1</i>	Threonine deaminase, catalyzes the first step in isoleucine biosynthesis; expression is under general amino acid control; ILV1 locus exhibits highly positioned nucleosomes whose organization is independent of known ILV1 regulation
28 F1	<i>YDR401W</i>	hyp. protein
29 D10	<i>VPS52</i>	Component of the GARP (Golgi-associated retrograde protein) complex, Vps51p-Vps52p-Vps53p-Vps54p, which is required for the recycling of proteins from endosomes to the late Golgi; involved in localization of actin and chitin
33 A3	<i>MRP17</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit; MRP17 exhibits genetic interactions with PET122, encoding a COX3-specific translational activator
33 A4	<i>OPI3</i>	Phospholipid methyltransferase (methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase), catalyzes the last two steps in phosphatidylcholine biosynthesis
33 C1	<i>ADO1</i>	Adenosine kinase, required for the utilization of S-adenosylmethionine (AdoMet); may be involved in recycling adenosine produced through the methyl cycle
33 G9	<i>VMA5</i>	Subunit C of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; required for the V1 domain to assemble onto the vacuolar membrane
34 B3	<i>PDC1</i>	Major of three pyruvate decarboxylase isozymes, key enzyme in alcoholic fermentation, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde; subject to glucose-, ethanol-, and autoregulation; involved in amino acid catabolism
35 C1	<i>PEP3</i>	Vacuolar peripheral membrane protein that promotes vesicular docking/fusion reactions in conjunction with SNARE proteins, required for vacuolar biogenesis, forms complex with Pep5p that mediates protein transport to the vacuole
39 G9	<i>PPA1</i>	Subunit c" of the vacuolar ATPase, which functions in acidification of the vacuole; one of three proteolipid subunits of the V0 domain
41 A1	<i>LYP1</i>	Lysine permease; one of three amino acid permeases (Alp1p, Can1p, Lyp1p) responsible for uptake of cationic amino acids
41 A2	<i>MRPL10</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit; appears as two protein spots (YmL10 and YmL18) on two-dimensional SDS gels
45 G8	<i>RBK1</i>	Putative ribokinase
47 A4	<i>GSH1</i>	Gamma glutamylcysteine synthetase, catalyzes the first step in the gamma-glutamyl cycle for glutathione (GSH) biosynthesis; expression induced by oxidants, cadmium, and mercury
48 C1	<i>VPH2</i>	Integral membrane protein required for vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase (V-ATPase) function, although not an actual component of the V-ATPase complex; functions in the assembly of the V-ATPase; localized to the endoplasmic reticulum (ER)
48 H2	<i>VPS1</i>	GTPase required for vacuolar protein sorting, functions in actin cytoskeleton organization via its interaction with Sla1p; required for late Golgi-retention of some proteins including Kex2p; involved in regulating peroxisome biogenesis
49 B1	<i>VPS34</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase responsible for the synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate; forms membrane-associated signal transduction complex with Vps15p to regulate protein sorting; similar to p110 subunit of mammalian PI 3-kinase
50 C5	<i>YLR352W</i>	Description Putative protein of unknown function with similarity to F-box proteins; interacts with Skp1p and Cdc53p; YLR352W is not an essential gene
50 G1	<i>VPS33</i>	ATP-binding protein that is a subunit of the homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting (HOPS) complex; essential for membrane docking and fusion at both the Golgi-to-endosome and endosome-to-vacuole stages of protein transport

**Nr. 10126132****sensitive Deletionsmutanten**

Pos.	Bez.	Funktion
51 A1	<i>DOM34</i>	Probable RNA-binding protein, functions in protein translation to promote G1 progression and differentiation, required for meiotic cell division

**Nr. 10126132****resistente Deletionsmutanten**

Pos.	Bez.	Funktion
08 H9	<i>YHR126C</i>	hyp. protein
08 F12	<i>YMR206W</i>	hyp. protein
33 E1	<i>ELM1</i>	Serine/threonine protein kinase that regulates cellular morphogenesis, septin behavior, and cytokinesis; required for the regulation of other kinases; forms part of the bud neck ring
38 C12	<i>MAL13</i>	MAL-activator protein, part of complex locus MAL1; nonfunctional in genomic reference strain S288C
02 B9	<i>YEL020C</i>	hyp. Protein
08 D8	<i>SPT21</i>	Description Protein required for normal transcription at several loci including HTA2-HTB2 and HHF2-HHT2, but not required at the other histone loci; functionally related to Spt10p; involved in telomere maintenance
08 F12	<i>YMR206W</i>	hyp. protein
15 H12	<i>YOL085C</i>	Description Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on experimental and comparative sequence data; partially overlaps the dubious gene YOL085W-A

**Nr. 9726054****sensitive Deletionsmutanten**

Pos.	Bez.	Funktion
03 H1	<i>IST3</i>	Component of the U2 snRNP
04 F5	<i>YIL029C</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)
05 E10	<i>ICE2</i>	Integral ER membrane protein with type-III transmembrane domains
11 A3	<i>ZWF1</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)
12 D11	<i>STD1</i>	Protein involved in control of glucose-regulated gene expression; interacts with protein kinase Snf1p, glucose sensors Snf3p and Rgt2p, and TATA-binding protein Spt15p; acts as a regulator of the transcription factor Rgt1p
12 D6	<i>CUE5</i>	Protein containing a CUE domain that binds ubiquitin, which may facilitate intramolecular monoubiquitination; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
12 H3	<i>YVC1</i>	Vacuolar cation channel, mediates release of Ca(2+) from the vacuole in response to hyperosmotic shock
13 C12	<i>VPS17</i>	Subunit of the membrane-associated retromer complex essential for endosome-to-Golgi retrograde protein transport
13 D9	<i>ARP8</i>	Nuclear actin-related protein involved in chromatin remodeling, component of chromatin-remodeling enzyme complexes
13 E7	<i>HNT3</i>	Member of the third branch of the histidine triad (HIT) superfamily of nucleotide-binding proteins; similar to Aprataxin, a Hint related protein that is mutated in individuals with ataxia with oculomotor apraxia

**Nr. 9726054**
**sensitive Deletionsmutanten**

<b>Pos.</b>	<b>Bez.</b>	<b>Funktion</b>
13 F2	<i>PET123</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
13 H4	<i>SER1</i>	3-phosphoserine aminotransferase
14 C12	<i>PRO2</i>	Gamma-glutamyl phosphate reductase
14 G7	<i>YOR366W</i>	hyp. protein
15 B11	<i>HTZ1</i>	Histone variant H2AZ
15 B12	<i>HRD1</i>	Ubiquitin-protein ligase required for endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) of misfolded proteins
15 B3	<i>SIN3</i>	DNA binding subunit of Sin3p-Rpd3p histone deacetylase complex
15 E12	<i>GSH2</i>	Glutathione synthetase
17 E9	<i>VMA13</i>	Subunit H of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of the vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase
18 H12	<i>YBL094C</i>	hyp. protein
19 B11	<i>FLR1</i>	Plasma membrane multidrug transporter of the major facilitator superfamily, involved in efflux of fluconazole, diazaborine, benomyl, methotrexate, and other drugs
19 C5	<i>CBP6</i>	Protein required for translation of the mitochondrial COB mRNA
19 F5	<i>RPS11B</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit
20 E12	<i>YBR147W</i>	Putative protein of unknown function; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies; null mutant displays fluconazole resistance
20 G4	<i>HIS7</i>	Imidazole glycerol phosphate synthase (glutamine amidotransferase:cyclase), catalyzes the fifth and sixth steps of histidine biosynthesis and also produces 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide (AICAR), a purine precursor
21 G9	<i>RVS161</i>	Amphiphysin-like lipid raft protein; subunit of a complex (Rvs161p-Rvs167p) that regulates polarization of the actin cytoskeleton, endocytosis, cell polarity, cell fusion and viability following starvation or osmotic stress
23 D12	<i>CRD1</i>	Cardiolipin synthase; produces cardiolipin, which is an important constituent of mitochondrial membranes; required for normal mitochondrial membrane potential and function
23 E9	<i>BUD30</i>	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; 96% of ORF overlaps the verified gene RPC53; diploid mutant displays a weak budding pattern phenotype in a systematic assay
23 F6	<i>DHH1</i>	Cytoplasmic DExD/H-box helicase, stimulates mRNA decapping, coordinates distinct steps in mRNA function and decay, interacts with both the decapping and deadenylase complexes, may have a role in mRNA export and translation
25 F6	<i>MRPL1</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
26 C3	<i>ARG82</i>	Inositol polyphosphate multikinase (IPMK), sequentially phosphorylates Ins(1,4,5)P3 to form Ins(1,3,4,5,6)P5; also has diphosphoinositol polyphosphate synthase activity; regulates arginine-, phosphate-, and nitrogen-responsive genes
26 C6	<i>NGG1</i>	Transcriptional regulator involved in glucose repression of Gal4p-regulated genes; component of transcriptional adaptor and histone acetyltransferase complexes, the ADA complex, the SAGA complex, and the SLIK complex
35 C1	<i>PEP3</i>	Vacuolar peripheral membrane protein that promotes vesicular docking/fusion reactions in conjunction with SNARE proteins, required for vacuolar biogenesis

**Nr. 9726054****sensitive Deletionsmutanten**

<b>Pos.</b>	<b>Bez.</b>	<b>Funktion</b>
47 A4	<i>GSH1</i>	Gamma glutamylcysteine synthetase

**Nr. 9726054****resistente Deletionsmutanten**

<b>Pos.</b>	<b>Bez.</b>	<b>Funktion</b>
02 B7	<i>EAF5</i>	Esa1p-associated factor, subunit of the NuA4 acetyltransferase complex
03 E6	<i>URM1</i>	Ubiquitin-like protein with weak sequence similarity to ubiquitin; depends on the E1-like activating enzyme Uba4p; molecular function of the Urm1p pathway is unknown, but it is required for normal growth, particularly at high temperature
04 F5	<i>YIL029C</i>	Putative protein of unknown function; deletion confers sensitivity to 4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino) phenylarsenoxide (GSAO)
05 F5	<i>LAS21</i>	Integral plasma membrane protein involved in the synthesis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure; mutations affect cell wall integrity
11 A2	<i>ATG2</i>	Peripheral membrane protein required for the formation of cytosolic sequestering vesicles involved in vacuolar import through both the Cvt pathway and autophagy; interacts with Atg9p and is necessary for its trafficking
11 A3	<i>ZWF1</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), catalyzes the first step of the pentose phosphate pathway; involved in adapting to oxidative stress; homolog of the human G6PD which is deficient in patients with hemolytic anemia
11 A4	<i>VAC7</i>	Integral vacuolar membrane protein involved in vacuole inheritance and morphology; activates Fab1p kinase activity under basal conditions and also after hyperosmotic shock
11 E9	<i>YNL187W</i>	Putative protein of unknown function; contains a consensus nuclear export signal (NES) sequence similar to the consensus sequence recognized by Crm1p; may interact with or be functionally redundant with Prp40p
14 C6	<i>MPD1</i>	Member of the protein disulfide isomerase (PDI) family; interacts with and inhibits the chaperone activity of Cne1p; MPD1 overexpression in a pdi1 null mutant suppresses defects in Pdi1p functions such as carboxypeptidase Y maturation
14 F4	<i>MEK1</i>	Meiosis-specific serine/threonine protein kinase, functions in meiotic checkpoint, promotes recombination between homologous chromosomes by suppressing double strand break repair between sister chromatids
15 G7	<i>RTG1</i>	Transcription factor (bHLH) involved in interorganelle communication between mitochondria, peroxisomes, and nucleus
17 A8	<i>TCO89</i>	Subunit of TORC1 (Tor1p or Tor2p-Kog1p-Lst8p-Tco89p), a complex that regulates growth in response to nutrient availability; cooperates with Ssd1p in the maintenance of cellular integrity; deletion strains are hypersensitive to rapamycin
22 A8	<i>LPD1</i>	Dihydrolipoamide dehydrogenase, the lipoamide dehydrogenase component (E3) of the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase multi-enzyme complexes
32 C3	<i>YGR149W</i>	Putative protein of unknown function; predicted to be an integral membrane protein
36 E12	<i>SVL3</i>	Protein of unknown function, mutant phenotype suggests a potential role in vacuolar function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery, cytoplasm, bud, and bud neck

**Nr. 10226069****sensitive Deletionsmutanten**

<b>Pos.</b>	<b>Bez.</b>	<b>Funktion</b>
01 E3	<i>CCR4</i>	Component of the CCR4-NOT transcriptional complex, which is involved in regulation of gene expression; component of the major cytoplasmic deadenylase, which is involved in mRNA poly(A) tail shortening
17 E9	<i>VMA13</i>	Subunit H of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of the vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase
23 F6	<i>DHH1</i>	Cytoplasmic DExD/H-box helicase, stimulates mRNA decapping, coordinates distinct steps in mRNA function and decay, interacts with both the decapping and deadenylase complexes, may have a role in mRNA export and translation
24 B5	<i>CAX4</i>	Dolichyl pyrophosphate (Dol-P-P) phosphatase with a lumenally oriented active site in the ER, cleaves the anhydride linkage in Dol-P-P, required for Dol-P-P-linked oligosaccharide intermediate synthesis and protein N-glycosylation
26 F2	<i>UME6</i>	Key transcriptional regulator of early meiotic genes, binds URS1 upstream regulatory sequence, couples metabolic responses to nutritional cues with initiation and progression of meiosis, forms complex with Ime1p, and also with Sin3p-Rpd3p
29 E6	<i>IZH1</i>	Membrane protein involved in zinc metabolism, member of the four-protein IZH family; transcription is regulated directly by Zap1p, expression induced by zinc deficiency and fatty acids; deletion increases sensitivity to elevated zinc
30 B4	<i>KAP122</i>	Karyopherin beta, responsible for import of the Toa1p-Toa2p complex into the nucleus; binds to nucleoporins Nup1p and Nup2p; may play a role in regulation of pleiotropic drug resistance
30 B8	<i>GET1</i>	Subunit of the GET complex; required for the retrieval of HDEL proteins from the Golgi to the ER in an ERD2 dependent fashion and for normal mitochondrial morphology and inheritance
30 C1	<i>PGD1</i>	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex; associates with core polymerase subunits to form the RNA polymerase II holoenzyme; essential for basal and activated transcription; direct target of Cyc8p-Tup1p transcriptional corepressor
43 C1	<i>CYS4</i>	Cystathionine beta-synthase, catalyzes the synthesis of cystathionine from serine and homocysteine, the first committed step in cysteine biosynthesis
47 A4	<i>GSH1</i>	Gamma glutamylcysteine synthetase
48 C1	<i>VPH2</i>	Integral membrane protein required for vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase (V-ATPase) function, although not an actual component of the V-ATPase complex; functions in the assembly of the V-ATPase; localized to the endoplasmic reticulum (ER)



**Nr. 10226069****resistente Deletionsmutanten**

<b>Pos.</b>	<b>Bez.</b>	<b>Funktion</b>
03 E5	<i>YIL054W</i>	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data
05 F6	<i>RSM25</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
15 H3	<i>MDM20</i>	Non-catalytic subunit of the NatB N-terminal acetyltransferase, which catalyzes N-acetylation of proteins with specific N-terminal sequences; involved in mitochondrial inheritance and actin assembly
16 A11	<i>SAM4</i>	S-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase, functions along with Mht1p in the conversion of S-adenosylmethionine (AdoMet) to methionine to control the methionine/AdoMet ratio
20 D1	<i>YBR209W</i>	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; YBR209W is not an essential gene
22 A2	<i>NHP10</i>	Protein related to mammalian high mobility group proteins; likely component of the INO80 complex, which is an ATP-dependent chromatin-remodeling complex
22 D3	<i>PRM7</i>	Pheromone-regulated protein, predicted to have one transmembrane segment; promoter contains Gcn4p binding elements
22 E1	<i>STP4</i>	Protein containing a Kruppel-type zinc-finger domain; has similarity to Stp1p, Stp2p, and Stp3p
27 G12	<i>ECM29</i>	Major component of the proteasome; tethers the proteasome core particle to the regulatory particle, and enhances the stability of the proteasome
33 D4	<i>PTM1</i>	Protein of unknown function, copurifies with late Golgi vesicles containing the v-SNARE Tlg2p
33 D6	<i>VPS24</i>	Description One of four subunits of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III); forms an ESCRT-III subcomplex with Did4p; involved in the sorting of transmembrane proteins into the multivesicular body (MVB) pathway
33 H9	<i>BUD2</i>	GTPase activating factor for Rsr1p/Bud1p required for both axial and bipolar budding patterns; mutants exhibit random budding in all cell types
38 C10	<i>BIO2</i>	Biotin synthase, catalyzes the conversion of dethiobiotin to biotin, which is the last step of the biotin biosynthesis pathway; complements E. coli bioB mutant
38 C12	<i>MAL13</i>	MAL-activator protein, part of complex locus MAL1; nonfunctional in genomic reference strain S288C
40 B1	<i>SWI4</i>	DNA binding component of the SBF complex (Swi4p-Swi6p), a transcriptional activator that in concert with MBF (Mbp1-Swi6p) regulates late G1-specific transcription of targets including cyclins and genes required for DNA synthesis and repair
40 H7	<i>STB2</i>	Protein that interacts with Sin3p in a two-hybrid assay and is part of a large protein complex with Sin3p and Stb1p